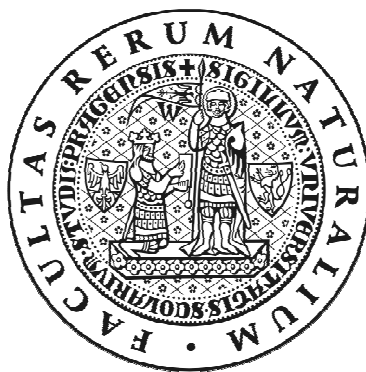


Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Martin Řeboun

**Vztah mezi mutagenitou a rozpustností nitrobenzanthronů ve vodných i nevodných
rozpouštědlech**

**Connection between the solubility and the mutagenicity of nitrobenzanthrones
in water and organic solvents**

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Václav Martínek Ph.D.

Praha, 2011

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli panu RNDr. Václavu Martínkovi Ph.D. za zadání zajímavého tématu. Zvláště pak za cenné rady, ochotu a trpělivost, kterou mi během práce věnoval.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 31. 5. 2011

Podpis

Martin Řeboun

Abstrakt:

2-Nitrobenzanthron a 3-nitrobenzanthron jsou polutanty široce zastoupené v životním prostředí. Mezi jejich zdroje se řadí automobilismus, ale třeba i spalování dřeva. 3-NBA je prokázaným mutagenem karcinogenem pro bakteriální a savčí systémy a je to pravděpodobný lidský mutagen. Po metabolické aktivaci může tvořit adukty s purinovými bázemi v molekule DNA.

2-NBA vykazuje o 3-4 řády nižší genotoxicitu, jedním z mechanismů přispívajícím k tomuto jevu může být velký rozdíl v rozpustnosti těchto izomerů, a tedy rozdíl v jejich biologické dostupnosti.

Jedním z cílů práce bylo stanovit rozpustnost 3-NBA a 2 NBA ve vodném a v methanolovém roztoku. Dílčím cílem bylo stanovení jejich extinkčních koeficientů pro výše uvedené roztoky.

Pro tato stanovení byly použity dvě různé metody. První metoda měření rozpustnosti byla založena na přidávání zásobního roztoku 3/2-NBA v dimethylsulfoxidu a spektrofotometrickém měření v oblasti platnosti Lambert-Beerova zákona. Další hodnoty rozpustnosti byly získány spektrofotometrickým stanovením koncentrací látek v roztoku nad sraženinou. U vodných roztoků 2-NBA byly hodnoty získány extrapolací.

Klíčová slova: rozpustnost, UV-VIS spektroskopie, 3-nitrobenzanthron, 2-nitrobenzanthron

Abstract:

2-Nitrobenzanthron (2-NBA) and 3-nitrobenzanthron (3-NBA) are pollutants widely occurring in the environment. The main sources of benzantrones are combustion products (i.e. diesel exhausts, wood and cigarette smoke ...). 3-NBA is proven mutagen and carcinogen for bacteria and mammals and it is probably mutagenic also to humans. Nitrobenzantrones can form covalent adducts with purine bases in DNA after their metabolic activation.

Genotoxic properties of 2-NBA are lower by 3-4 orders of magnitudes in comparison to 3-NBA, large difference in the solubility, and therefore also the difference in their bioavailability, of these isomers can be among the factors explaining this phenomenon.

One of our goals was to determine the solubility of 3-NBA and 2-NBA in water and in methanol. The second objective was to determine the extinction coefficients for their solutions in water and methanol.

Two different methods were employed to determine the solubility of 3-NBA and 2-NBA. The first method was based on stepwise adding of the stock solution of 3-/2-NBA in dimethylsulfoxide to excessive volume of water and simultaneous spectrophotometric verification of the Lambert-Beer law. Additional experiments confirmed the solubility of 3-/2-NBA utilizing spectrophotometric determination of 3-/2-NBA concentration in equilibrium with solid phase. The solubility of 2-NBA in aqueous solution was obtained by extrapolation. Extinction coefficients for 3-NBA in water and 3-/2-NBA in methanol were obtained by measuring the dependency of extinction on solute concentration.

(In Czech)

Keywords: solubility, UV-VIS spectroscopy, 3-nitrobenzanthrone, 2-nitrobenzanthrone

Obsah:

ABSTRAKT:	4
ABSTRACT:	5
OBSAH:	6
SEZNAM ZKRATEK:	8
1. ÚVOD	10
1.1 KARCINOGENEZE	10
1.1.1 Fáze karcinogeneze	11
1.1.2 Faktory ovlivňující karcinogenezi	12
1.2 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK	12
1.2.1 Derivatizační fáze	13
1.2.2 Konjugační fáze	13
1.3 NITROAROMATICKÉ SLOUČENINY-POLUTANTY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ	13
1.4 NITROBENZANTHRONY - VÝSKYT A PŮVOD	14
1.5 3-NITROBENZANTHRON	19
1.5.1 Aktivace 3-NBA v organismu	20
1.5.2 Mechanismus působení 3-NBA v organismu	21
1.6 2- NITROBENZANTHRON	22
2. CÍL PRÁCE	23
3. MATERIÁL A METODY	24
3.1 LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE	24
3.2 METODA A POSTUP PRÁCE	25
3.2.1 Příprava zásobních roztoků	25
3.2.2 Měření absorbance roztoků 2- a 3-NBA na spektrofotometru HP 8453	25
4. VÝSLEDKY	31
4.1 URČENÍ EXTINKČNÍCH KOEFICIENTŮ ROZTOKŮ 3-NBA A 2-NBA	31
4.1.1 Extinkční koeficient 3-NBA ve vodě	31
4.1.2 Extinkční koeficient 3-NBA v methanolu	31
4.1.3 Extinkční koeficient 2-NBA v methanolu	32
4.2 STANOVENÍ ROZPUSTNOSTI 3-NBA	33
4.2.1 Stanovení rozpustnosti 3-NBA ve vodě pomocí ověření platnosti Lambert-Beerova zákona	33
4.2.2 Stanovení rozpustnosti 3-NBA v methanolu pomocí ověření platnosti Lambert-Beerova zákona	35
4.2.3 Stanovení rozpustnosti 3-NBA měřením koncentrace látky nad sraženinou	35

4.2.4	Stanovení změny koncentrace ve vodném roztoku 3-NBA v čase	36
4.2.5	Stanovení vlivu DMSO na koncentraci 3-NBA ve vodném roztoku.....	36
4.3	STANOVENÍ ROZPUSTNOSTI 2-NBA.....	37
4.3.1	Stanovení rozpustnosti 2-NBA ve vodě pomocí ověření platnosti Lambert-Beerova zákona.....	37
4.3.2	Stanovení rozpustnosti 2-NBA v methanolu pomocí ověření platnosti Lambert-Beerova zákona.....	39
4.3.3	Stanovení rozpustnosti 2-NBA měřením koncentrace látky nad sraženinou	40
4.3.4	Stanovení rozpustnosti 2-NBA ve vodě pomocí extrapolace	40
5.	ZÁVĚR A DISKUZE.....	41
6.	CITOVANÁ LITERATURA	44

Seznam zkratek:

PAH	Polycyklické aromatické uhlovodíky
N-PAH	Nitroaromatické polycyklické uhlovodíky
p. p. m.	Miliontina z celku (part per milion)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
NBA	Nitrobenzanthron
BZ	Benzanthron
1-NBA	1-nitrobenzanthron
2-NBA	2-nitrobenzanthron
3-NBA	3-nitrobenzanthron
9-NBA	9-nitrobenzanthron
11-NBA	11-nitrobenzanthron
3,9-DNBA	3,9- dinitrobenzanthron
3,11-DNBA	3,11-dinitrobenzanthron
3,9,11-TNBA	3,9,11-trinitrobenzanthron
S9 frakce	Supernatant směsi jaterních enzymů při centrifugovaní při 9000 g
LUMO	nejnižší neobsazený molekulový orbital
GC/MS-SIM	plynová chromatografie/ hmotnostní spektrometrie- selektivní iont monitoring
MS	Hmotnostní spektrometrie
3-ABA	3-aminobenzanthron
N-OH-ABA	N-hydroxy-3-aminobenzanthron
XO	Xanthin oxidáza
NQO1	NAD(P)H chinon oxidoreduktáza
POR	Cytochrom P450 reduktáza
NAT1, NAT2	N,O-acetyltransferáza 1 a 2
SULT1A1, SULT1A2	Sulfotransferáza 1A1 a 1A2
CYP1A1, CYP1A2	cytochrom P450 1A1, 1A2
PHS	Prostaglandin H syntéza

LPO	Laktoperoxidáza
HPR	Křenová peroxidáza
HPLC	Vysokotlaká chromatografie
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
dG	Deoxyguanosin
dA	Deoxyadenosin
dA-N ⁶ -ABA	2-(2'-deoxyadenosin-N ⁶ -yl)-3-aminobenzanthron
dG-N ² -ABA	N-(2'-deoxyguanosin-N ² -yl)-3-aminobenzantron
dG-C8-N-ABA	N-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzantron
dA-C8-N-ABA	N-(2'-deoxyadenosin-8-yl)-3-aminobenzanthron
DMSO	dimethylsulfoxid
A	absorbance
SD	Standardní směrodatná odchylka

1. Úvod

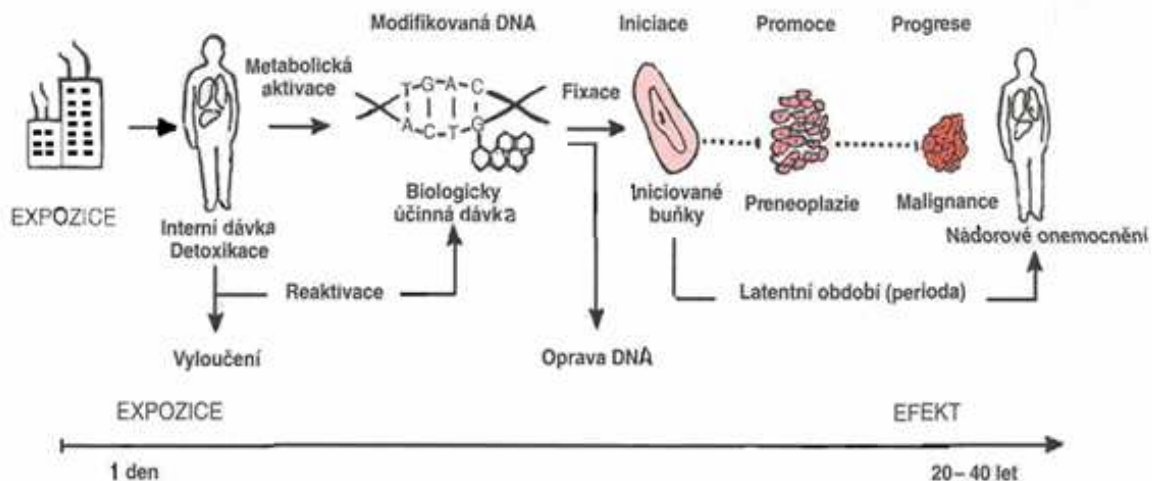
Pohodlný styl života, zastoupený například stálým masivním rozvojem automobilismu, nekvalitním stravováním, vysokým znečištěním a degradací životního prostředí z průmyslových výroby a domácností, vede k rozvoji civilizačních chorob. Aby současný styl života byl i kvalitním stylem, je třeba objasnit mechanismy působení těchto faktorů tak, abychom mohli nemoci efektivně léčit, či jim dokonce předcházet.

Mezi civilizační choroby řadíme i rakovinová onemocnění. Na jejich vzniku se mohou podílet i nitro aromatické polycyklické uhlovodíky, které v těle mohou projít metabolickou aktivací a následným vznikem kovalentních aduktů s nukleovými kyselinami napomáhají vzniku nádorového onemocnění.

1.1 Karcinogeneze

Karcinogeneze je několikastupňový proces, při němž dochází ke vzniku a růstu nádoru tkáně, která abnormálně a neregulovatelně proliferuje (Obrázek 1). V iniciační fázi dochází například ke kovalentní modifikaci molekul DNA somatických buněk, pokud tyto nejsou včas opraveny, dochází k hromadění poruch genů. Tyto poruchy se následně projevují ve špatné funkci proteinů a také v poruchách regulace buněčných dějů [1]. Pro karcinogenezi jsou nejzávažnější poruchy proteinů kontrolujících expresi genů a replikaci DNA. Dále to mohou být proteiny podílející se na přenosu signálů, regulaci buněčného cyklu, dělení, diferenciaci a řízení zániku buněk (apoptozy) [1].

Ke klíčovým regulačním genům náleží především tumorsupresorové geny a protoonkogeny. Produktem tumorsupresorových genů jsou proteiny omezující proliferaci a onkogeny kódující onkoproteiny, které se podílejí na regulaci mitosy [1,2].



Obrázek 1: Průběh karcinogeneze (převzato z [3]). Na obrázku je znázorněn průběh karcinogeneze počínající expozicí přes modifikaci DNA vedoucí ke třem fázím karcinogeneze až k růstu nádoru. Na obrázku dole je znázorněna časová osa (desítky let) od vystavení organismu škodlivinám po nádorové onemocnění.

1.1.1 Fáze karcinogeneze

Proces karcinogeneze se dá rozdělit do tří fází: iniciace, promoce a progrese.

Při první fázi, **iniciaci**, dochází ke změně zdravé buňky na buňku iniciovanou, tedy takovou, u které nebyla mutace DNA opravena reparačními enzymy. Buňka je buď odstraněna z organismu, nebo v něm zůstává a prodělává proliferaci. Vznik iniciované buňky není v organismu ničím výjimečným a ve většině případů bývá buňka automaticky odstraněna imunitním systémem. **Promoční fáze** může trvat až desítky let a vzniká při ní tzv. preneplasie, benigní nádor, který už nemůže imunitní systém efektivně zlikvidovat. Proto, pokud není odstraněn, vede k třetí fázi karcinogeneze. Třetím stupněm karcinogeneze je **fáze progresivní**. Při ní dochází k nekontrolovatelnému dělení a maligní transformací vznikají kovalentní modifikace DNA a genotoxická tvorba aduktů s DNA. Maligní (zhoubný) nádor je invazivní a může metastázovat do dalších tkání[4,5].

1.1.2 Faktory ovlivňující karcinogenezi

Existují tři základní skupiny faktorů: biologické, fyzikální a chemické.

Mezi biologické faktory se řadí například onkoviry, vyznačující se schopností vkládat svoji DNA do DNA hostitele. Dalším faktorem může být také změna ve fungování imunitního systému, například vlivem stresu nebo výživy [6].

Významnými fyzikálními faktory karcinogeneze jsou různé druhy ionizačního záření (ultrafialové, Rentgenovo nebo radioaktivní). Dále to mohou být částice azbestu, sloučenin beryllia nebo uhlýný prach [2].

Poslední skupinou jsou faktory chemické. Těmi se rozumí nejrůznější sloučeniny, souhrnně označované jako chemické karcinogeny, které zapříčiňují změny v DNA. Tyto karcinogeny můžeme dělit podle toho, jestli působí přímo (ultimativní karcinogeny), nebo jestli musí projít metabolickou aktivací (proximální karcinogeny). Dále se chemické karcinogeny dají dělit podle mechanismu účinku na genotoxické, které tvoří kovalentní adukty s DNA, dále na epigenetické tvořící nekovalentní interakce s DNA (jako příklad lze uvést vmezeření se do dvoušroubovice DNA), a konečně na karcinogeny způsobující změny ve struktuře DNA. Ty se projevují jako jedno a dvou řetězcové zlomy, nebo propojení molekul (DNA-DNA cross-linking, DNA-protein cross-linking) [1,4].

1.2 Biotransformace xenobiotik

Biotransformace xenobiotik je souhrnný název procesů, které mají za cíl snížit toxicitu cizorodé látky a následně ji vyloučit z organismu. Tyto reakce se označují jako detoxikační. Pokud se zvýší toxický účinek látky, dochází k reakcím aktivačním. Tím může dojít k přeměně nemutagenní látky na látku mutagenní, nebo se léčivá látka může dostat do své aktivní formy [2,4].

Nepolární xenobiotika mají tendenci procházet membránami, tím se v organismu zadržují a hromadí. Proto při biotransformaci dochází k polarizaci látky, ta pak může být z těla vyloučena např. močí nebo žlučí rychleji. U biotransformace rozeznáváme dvě fáze: derivatizační a konjugační [2,4].

1.2.1 Derivatizační fáze

Při této fázi dochází ke zvýšení polarity molekuly, a to buď zaváděním polárních skupin, nebo demaskováním stávajících funkčních skupin. Nejčastěji to jsou oxidační reakce jako C-hydroxylace, N-hydroxylace, N-oxidace nebo S-oxidace. Z dalších můžeme jmenovat oxidaci alkoholů a aldehydů nebo oxidaci dvojnásobné vazby. Jinou reakcí pro přeměnu xenobiotik představuje redukce, jejímž příkladem je přeměna ketonů na sekundární alkoholy nebo redukce nitrosloučenin na aminy. Třetí možnou variantou je hydrolytické demaskování funkčních skupin. Jedná se např. o hydrolyzu esterů za vzniku fenolů a karboxylů nebo o hydrolyzu amidů za vzniku aminů [2,4].

1.2.2 Konjugační fáze

Pro tuto fázi je příznačná reakce derivatizovaného xenobiotika se silně hydrofilními, snadno vyloučitelnými sloučeninami (např. s kyselinou glukuronovou, sulfátem, ...) [2].

1.3 Nitroaromatické sloučeniny-polutanty životního prostředí

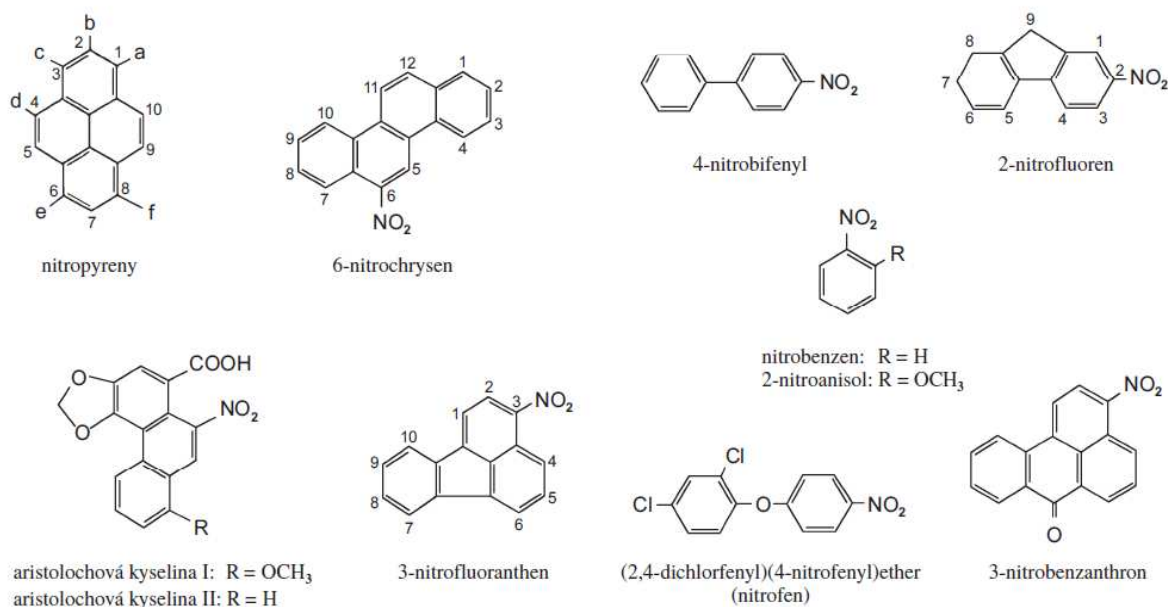
Mezi významné kontaminanty životního prostředí patří ve velké míře aromatické nitrosloučeniny. Jsou významné pro své toxikologické a karcinogenní vlastnosti. Tyto látky jsou zastoupeny ve všech složkách životního prostředí. Jejich zdrojem jsou především vysokoteplotní procesy s nedokonalým spalováním, proto se nachází ve zplodinách vznětových a zážehových motorů, v prachových částicích, ale třeba i v říčních sedimentech. Mezi časté zdroje však musíme zařadit i cigaretový kouř nebo přípravu grilovaných jídel [7] [8]. Nitroaromatické sloučeniny např. vznikají z oxidů dusíku po reakci s polycyklickými aromatickými uhlovodíky [7].

Většina nitroaromatických sloučenin vykazuje mutagenní aktivitu v bakteriálních i savčích systémech. Ačkoliv nebyl v lidském organismu jejich účinek dosud jednoznačně prokázán, jsou považovány za karcinogeny zapojující se do nádorových procesů. Cílovými orgány jsou především játra, ledviny, plíce a prsní žlázy [7].

Národní toxikologický program USA a Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny označily za silně podezřelé nitroaromatické uhlovodíky (N-PAH): 2-nitroanizol, který se používá k výrobě meziproduktů u azobarviv, 1-nitropyren, 4-nitropyren, 1,6-dinitropyren a 1,8-dinitropyren, látky, které jsou obsaženy ve výfukových plynech dieslových motorů. Dále 6-nitrochrysen, nitrofen a jako poslední 2-nitrofluoren. Mezi podezřelé karcinogeny jsou

zařazeny také produkty aristolochové kyseliny, jediného přírodního nitropolyaromatického uhlovodíku obsaženého v rostlinách z čeledi podražcovitých (Aristolochiaceae) [7].

Jedním z posledních objevených N-PAH je 3-nitrobenzanthron, patřící mezi nejsilnější doposud nalezené mutageny. Je součástí spalin vznětových motorů [9].



Obrázek 2: Struktura nitroaromátů rizikových pro lidský organizmus (převzato z [7]) a je NO₂ a b-F jsou vodíky pro 1-nitropyren, b je NO₂ a, c-f jsou vodíky pro 2-nitropyren, d je NO₂ a A-c jsou vodíky pro 4-nitropyren, a+c jsou NO₂ b+d-f jsou vodíky pro 1,3-dinitropyren, a+e jsou NO₂ b-d+f jsou H pro 1,6-dinitropyren, a +f jsou NO₂ b-f jsou vodíky pro 1,8-dinitropyren

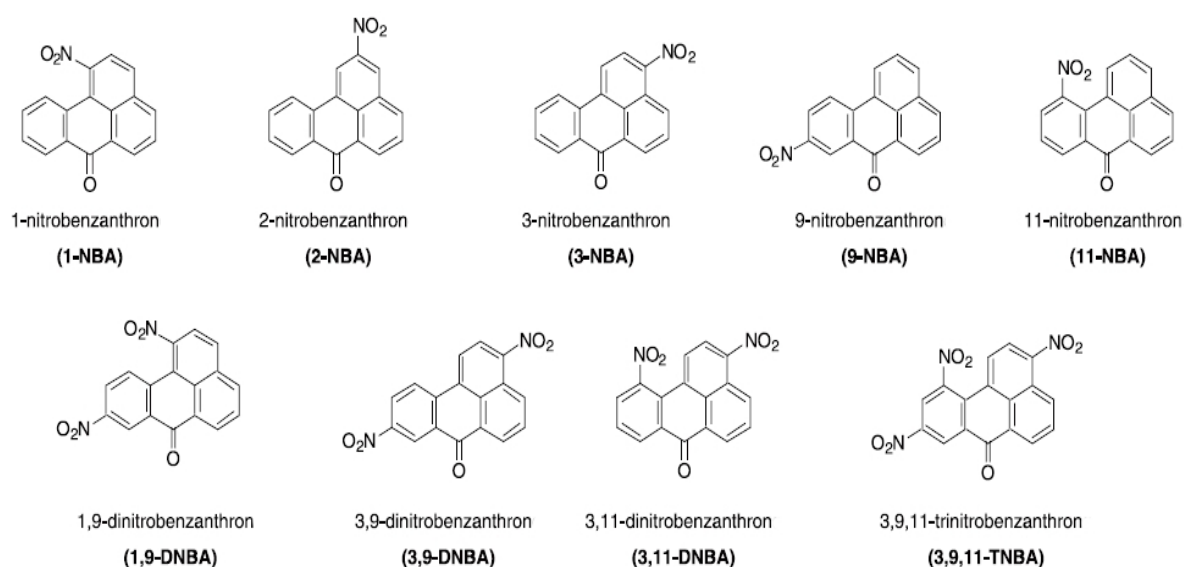
1.4 Nitrobenzanthrony - výskyt a původ

První práci potvrzující detekci nitrobenzanthronů (NBA) v extraktu ze spalin dieselových motorů a z prachových částic v ovzduší publikovala Hitomi Suzuki a její spolupracovníci v roce 1997 [10]. Od té doby byly NBA zjištěny ve všech složkách životního prostředí. Značné množství nitrobenzanthronů se produkuje při nedokonalém spalování ve spalovacích motorech, jsou však obsaženy i v sazích vzniklých při spalování dřeva v lokálních topeništích [11].

Nitrobenzanthrony vznikají reakcí mateřské sloučeniny benzanthronu s oxidy dusíku. Např. 3-NBA, jeden z derivátů nitrobenzanthronu, se tak vytváří za atmosférických

podmínek, třebaže je jeho příprava snadnější v umělé atmosféře s obsahem BZ, oxidu dusičitého a ozonů [11,12].

Laboratorně bylo připraveno a zkoumáno 9 nitrosloučenin benzanthronu (Obrázek 3). Jeho monoderiváty jsou: 1-nitrobenzanthron (1-NBA), 2-nitrobenzanthron (2-NBA), 3-nitrobenzanthron, 9-nitrobenzanthron (9-NBA) a 11-nitrobenzanthron. K dinitroderivátům patří 3,9- dinitrobenzanthron (3,9-DNBA) a 3,11-dinitrobenzanthron (3,11-DNBA). Zkoumán byl také trinitro derivát, a to 3,9,11-trinitrobenzanthron (3,9,11-TNBA).



Obrázek 3: Strukturní vzorce nitrobenzanthronů (převzato z [11]). První řádek zleva 1-NBA: 1-nitrobenzanthron, 2-NBA: 2-nitrobenzanthron, 3-NBA: 3-nitrobenzanthron, 9-NBA: 9-nitrobenzanthron, 11-NBA: 11-nitrobenzanthron, Druhý řádek zleva 1,9-DNBA: 1,9-dinitrobenzanthron, 3,9-DNBA: 3,9-dinitrobenzanthron, 3,11-DNBA: 3,11-dinitrobenzanthron, 3,9,11-TNBA: 3,9,11-trinitrobenzanthron

Tabulka 1: Mutagenita nitro derivátů BA v různých kmenech o rozdílné metabolické kapacitě bez S9 mix (převzato z [11]). Zajímavá jsou především data pro kmeny TA98 a YG1024 a 2/3-NBA.

Kmen	Ta98	TA98NR	TA98/1,8DNP6	YG1021	YG1024	TA100
1-NBA	5560	5230	4780	8480	19830	4590
2-NBA	160	8	160	1820	3060	390
3-NBA	208400	150200	52330	128900	6292000	29790
9-NBA	84870	27490	21530	26100	490400	3270
11-NBA	6	3	2	10	46	6
1,9-DNBA	41500	3150	3280	17540	268900	280
3,9-DNBA	46560	57550	51140	25070	223700	4340
3,11-DNBA	3330	2520	4770	3110	12200	360
3,9,11-TNBA	29400	2400	640	8270	230800	174

U těchto sloučenin byly zkoumány jejich mutagenní vlastnosti pomocí Amesova testu na různých kmenech bakterie *Salmonella typhimurium*, a to také v přítomnosti S9 frakce obsahující jaterní mikrosomální enzymy jako aktivační systém [13]. Výsledek těchto testů, publikovaný roce 2006, přinesl zjištění, že mutagenita těchto látek se pohybuje v rozmezí 6-208 400 rev/nmol pro kmen TA98 bez S9 mix (Tabulka 1). Vysoké rozmezí bylo konstatováno i pro kmeny s přidavkem S9 frakce. (Tabulka 2) [11].

Tabulka 2: Mutagenita nitro derivátů BA v různých kmenech o rozdílné metabolické kapacitě s S9 mix (převzato z [11])

Kmen	Ta98	TA100	YG1021	YG1024
1-NBA	39	5	16	20
2-NBA	153	59	204	203
3-NBA	1114	112	3332	18570
9-NBA	1010	202	6849	5610
11-NBA	/	/	/	/
1,9-DNBA	200	12	909	1240
3,9-DNBA	956	64	13781	8266
3,11-DNBA	21	18	26	50
3,9,11-TNBA	109	17	2127	886

K dalším výsledkům studie patří zjištění, že mutagenní aktivita derivátů NBA není ovlivněna jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi (Tabulka 3), k nimž řadíme energii

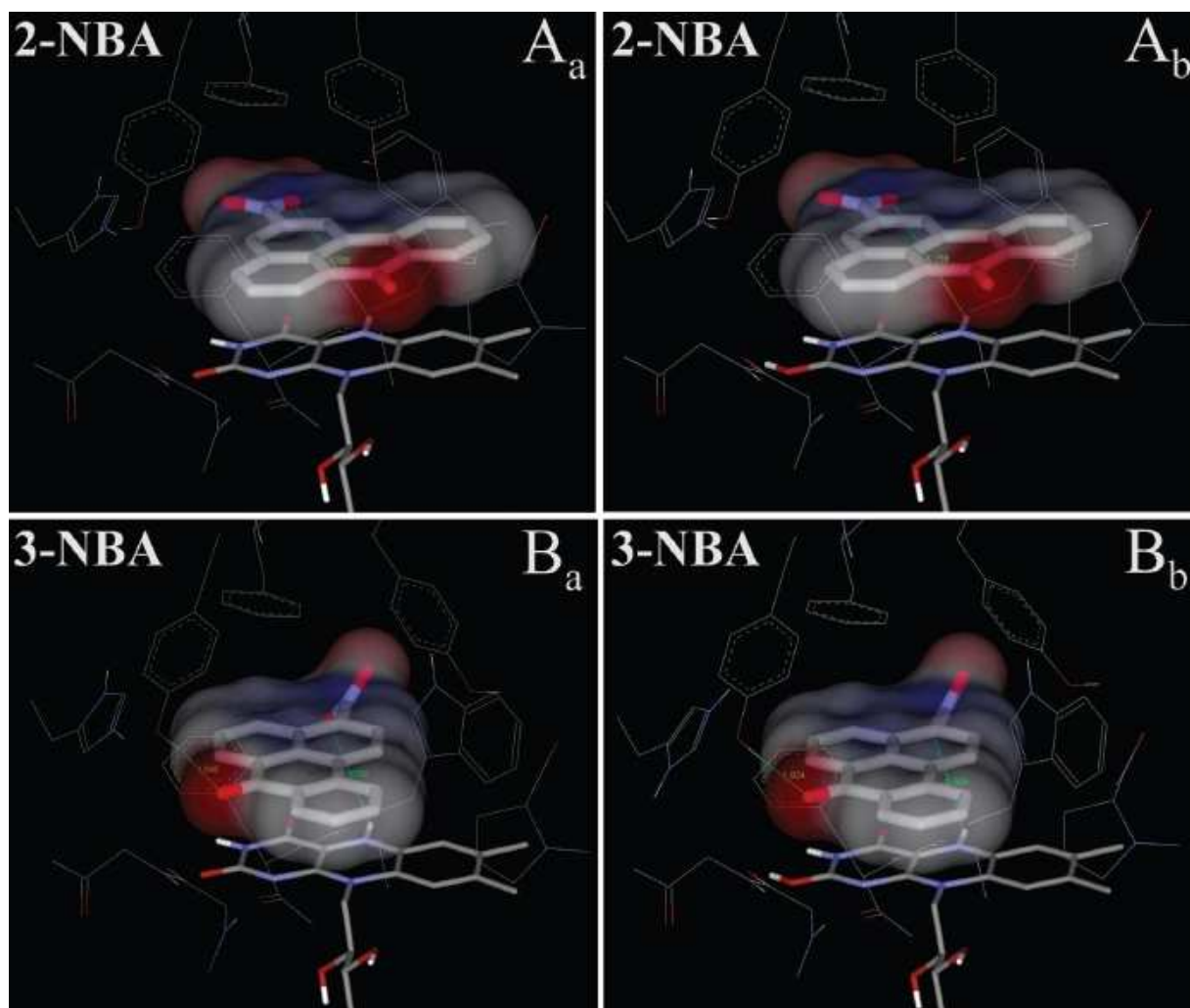
nejnižšího neobsazeného orbitalu (LUMO), jejich redukční potenciál, orientaci nitroskupiny nebo hydrofobicitu, která byla ve studii znázorněna pomocí rozdělovacího koeficientu oktanol-voda získaného z chromatografických dat. Hodnoty dekadického logaritmu se pohybují od 3,60-3,99, což je rozdíl pouhých 0,39. To vedlo autory studie k závěru, že prostupnost NBA do buněk je prakticky stejná a není rozhodujícím faktorem pro mutagenitu [11].

Další práce se pak zaměřily na porovnání aktivace vybraných nitroderivátů benzanthronu, mimo jiné také na ultimátní karcinogen - nitreniový iont, který při metabolické aktivaci NBA v buňce vzniká. Závěrem studie bylo zjištění, že mutagenní vlastnosti těchto sloučenin korelují se stabilitou jejich nitreniového iontu [14].

Tabulka 3: Přehled fyzikálně-chemických vlastností různých NBA [11]. Dekadický logaritmus mutagenicity u kmenu TA98, LUMO - Energie nejnižšího neobsazeného molekulového orbitalu. E_{red} – redukční potenciál, $\log K_{ow}$ - dekadický logaritmus rozdělovací rovnováhy oktanol - voda znázorňující hydrofobicitu.

	Log TA98	LUMO (eV)	E_{red} (mV)	Log K_{ow}	dihedrál ní úhel (stupně °)				
					1	2	3	9	11
1-NBA	3,75	-1.896	-1063	3,60	62,3				
2-NBA	2,20	-1,909	-1113	3,99		1,1			
3-NBA	5,32	-2,099	-987	3,90			0		
9-NBA	4,93	-1,929	-1087	3,79				2,5	
11-NBA	0,78	-1,722	-1084	3,67					64,2
1,9-DNBA	4,62	-2,435	-854	3,75	60,9			0,8	
3,9-DNBA	4,67	-2,605	-833	3,82			0,5	1	
3,11-DNBA	3,52	-2,417	-861	3,79			10,4		69,8
3,9,11-TNBA	4,47	-2,934	-703	3,61			13,8	1,9	63,7

Navazující práce pak potvrdila významný rozdíl v rovnovážných konstantách hydrolytických reakcí vedoucích k tvorbě ultimárních karcinogenů. Podle těchto výsledků se ukazuje, že metabolity 2-NBA se na příslušný nitreniový iont rozpadají o 3 - 4 řády méně ochotněji než metabolity 3-NBA [15]. Dále byly pozorovány rozdíly v efektivitě redukce 2- a 3-NBA bakteriálními reduktázami a také savčí chinon:oxidoreduktázou (NQO1) [14]. Bylo zjištěno, že na rozdíl od 3-NBA, redukce 2-NBA chinon:oxidoreduktázou *in vitro* prakticky neprobíhá, tedy nebyly detekovány jeho redukční metabolity ani adukty s DNA[15]. Zdálo by se tedy, že 2-NBA je velmi špatným substrátem reduktázy, a proto je jeho aktivace mnohem pomalejší.



Obrázek 4: znázornění vazby 2/3- NBA do aktivního místa NQO1 (převzato z [15]). 3-NBA se váže ve formě vhodnější pro redukci než 2-NBA.

Teoretické výpočty však ukazují, že by se 2-NBA měl vázat do aktivního centra enzymu podobně jako 3-NBA, i když v orientaci poněkud méně vhodné pro redukci (Obrázek 4). Je však nepravděpodobné, že by tento poměrně malý rozdíl mohl prakticky znemožnit redukci 2-NBA zkoumanou reduktázou. [15] Prezentovaná práce se pak snaží přispět k objasnění toho rozporu, který by mohl být vysvětlen výraznými rozdíly v rozpustnosti těchto dvou izomerů.

Ukazuje se, že v savčích systémech se mutagenita nitrobenzanthronů pravděpodobně ještě zvyšuje kvůli enzymatickému systému (sulfotransferázy, N-acetyltrasferázy), který se podílí na jejich aktivaci prostřednictvím konjugačních reakcí a je jiný než u buněk bakteriálních [11,16].

1.5 3-nitrobenzanthron

3-nitrobenzanthron, systematickým názvem 3-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on, je polycyklickou aromatickou sloučeninou, běžně se vyskytující v životním prostředí. Byl nalezen v částicích vzniklých při činnosti naftových spalovacích motorů, kde se patrně vytváří nedokonalým spalováním nafty přímo v motoru, nebo následně reakcí BZ s oxidy dusíku v atmosféře. Nachází se v prachových částicích ve vzduchu v obytných a průmyslových oblastech s vyšším podílem dopravy. Genotoxickým účinkům jsou tak vystaveni zejména zaměstnanci v automobilové dopravě: řidiči, automechanici, popřípadě obsluhy čerpacích stanic. U horníků v solných dolech, vystavených dieselovým zplodinám, byl v moči nalezen hlavní metabolit 3-NBA, a to 3-aminobenzanthron [11,12,14].

3-NBA je ze vzduchu vymýván dešťovou vodou do povrchových půd. 3-NBA byl nalezen i v sazích z krbů ve městě Shenyang na severu Číny (Tabulka 4) [12].

Koncentrace 3-NBA v ovzduší je srovnatelná s jinými N-PAH, např. nitropyreny nebo benzo(a)pyreny, a pohybuje se v rozmezí od 0,6 do 6,6 p.p.m. Denní dávka se pohybuje okolo 90 pg [17].

Tabulka 4: Přehled zdrojů a změřených koncentrací 3-NBA v životním prostředí, převzata podle [12].

zdroj	koncentrace	země
Částice vzniklé spalováním nafty	<0,001- 6,61 µg/g částic	Japonsko
Částice vzniklé spalováním nafty	0,027 - 0,056 µg/g částic	Japonsko
Částice vzniklé spalováním nafty	Rozpoznáno pomocí GC-MS SIM	USA
Prachové částice	5,2 - 11,5 pg/m ³ vzduchu	Japonsko
Prachové částice	Pokusně identifikováno MS	USA
Prachové částice	ND* - 68,4 pg/m ³ vzduchu	Dánsko
Prachové částice	ND* - 80 pg/m ³ vzduchu	Německo
Prachové částice	0,4 pg/m ³ vzduchu	USA
Prachové částice	6,79 pg/m ³ vzduchu	Japonsko
Dešťová voda	0,07 - 2,6ng/l vody	Japonsko
Povrchové půdy	1,2 - 1020 pg/g půdy	Japonsko
Povrchové půdy	144 - 1158 pg/g půdy	Japonsko
Částice ze spalování pevných paliv	0,234µg/g částic	Čína

*ND= nedetekováno

3-NBA je potvrzeným mutagenem a karcinogenem pro bakteriální, ale i savčí systémy. Je také předpokládaným karcinogenem pro člověka. Ze všech derivátů nitrobenzanthronů vykazuje právě 3-NBA nejvyšší mutagenitu pro bakteriální kmen TA98. Pro kmen YG1024

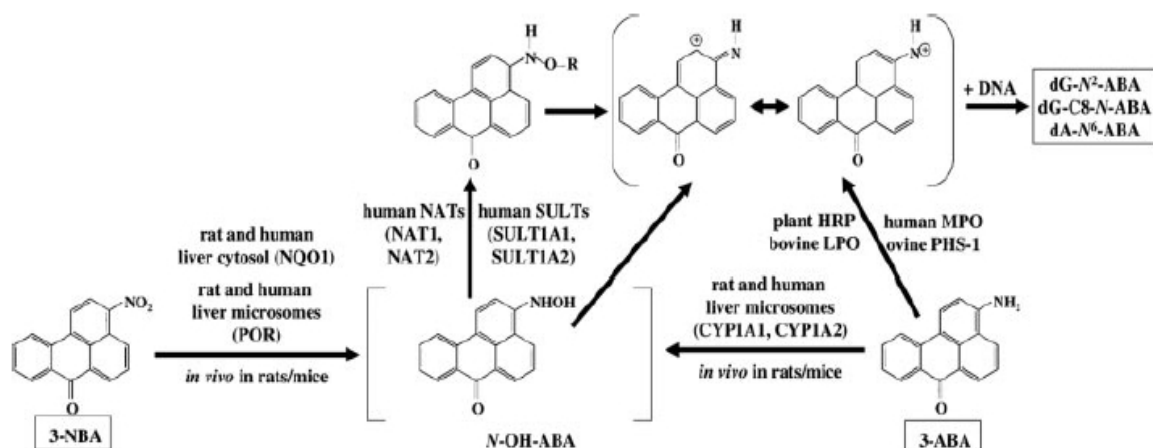
přesahují jeho mutagenní vlastnosti 6 miliónů rev/nmol (Tabulka 1). Genotoxické vlastnosti byly prokázány v buněčných kulturách, ale i v organismu laboratorních hlodavců (potkanů a myší) [11].

1.5.1 Aktivace 3-NBA v organismu

Zjistit, které enzymy se uplatňují při metabolické aktivaci karcinogenu 3-NBA, je důležité pro posouzení individuální citlivosti jednotlivých organismů, zvláště pak člověka [12]. Stanovení aktivačních enzymů bylo prováděno pomocí *in vitro* testů na potkaních a lidských jaterních mikrozomech a cytosolu. Testy prokazují, že hlavní redukční cesta, v první části biotransformace (Obrázek 5) z 3-NBA na N-hydroxy-3-aminobenzanthron (N-OH-ABA) probíhá přes prostou nitroredukcí, katalyzovanou pomocí cytosolárních reduktáz jako jsou xanthin oxidázy (XO), NAD(P)H chinon oxidoreduktázy (NQO1), nebo pomocí mikrozomální cytochrom P450 reduktázy (POR). Nicméně pomocí *in vivo* testů jaterního POR-Null myší se ukázalo, že aktivace se spíše účastní cytosolární reduktázy než mikrozomální POR [17-20].

Vzniklý N-OH-ABA je nestabilní [17]. Jeho přeměna pokračuje na nitréniový iont, který může tvořit adukty s DNA. Nebo se přemění na karbéniový iont, který následně reaguje s DNA a vytváří s ní specifické adukty. Hlavními aktivačními enzymy druhé fáze jsou N,O-acetyltransferázy (NAT), a to převážně NAT2 s menším podílem NAT1, a sulfotransferázy (SULT), majoritně SULT1A1 a v menší míře SULT1A2. Všechny enzymy druhé fáze biotransformace se vyskytují v buňkách dýchací soustavy. Enzymy NAT2 a SULT1A2 jsou navíc obsaženy v jaterních buňkách [18-20].

Nicméně N-OH-ABA může podléhat redukcí až na 3-ABA, který může být znovu oxidován na N-OH-ABA. Proto může být oxidace 3-ABA další aktivační cestou vedoucí až k tvorbě DNA aduktů. V jaterních mikrozomech a v plicích je tento děj katalyzován pomocí cytochromů P450 (CYP), kde CYP1A1 a CYP1A2 jsou hlavními enzymy reakce. Jako druhotné aktivační enzymy 3-ABA jsou peroxidázy, jejichž substrátem může být peroxid vodíku dodávaný prostřednictvím XO z metabolické aktivace 3-NBA. Aktivace pomocí peroxidáz probíhá v orgánech, ve kterých se CYP1A1 a CYP1A2 prakticky nevyskytují. K těmto orgánům náleží plíce, ledviny, močový měchýř či prsní žlázy. Peroxidázy řadící se do této skupiny jsou: prostaglandin H syntáza (PHS), laktoperoxidáza (LPO), myeloperoxidáza a jako model i křenová peroxidáza (HRP). Při aktivaci pomocí peroxidáz mohou vznikat radikály, které mohou poškozovat DNA [19,20].



Obrázek 5: Schéma cesty metabolické aktivace 3-NBA v organismu. 3-NBA se redukuje pomocí NQO1 a POR na N- hydroxy aminobenzanthron, ten přechází na nitreniový iont, který se může přesmyknout na karboniový iont a tvořit adukty s DNA. Na obrázku je znázorněna i cesta začínající od 3-aminobenzanthronu.

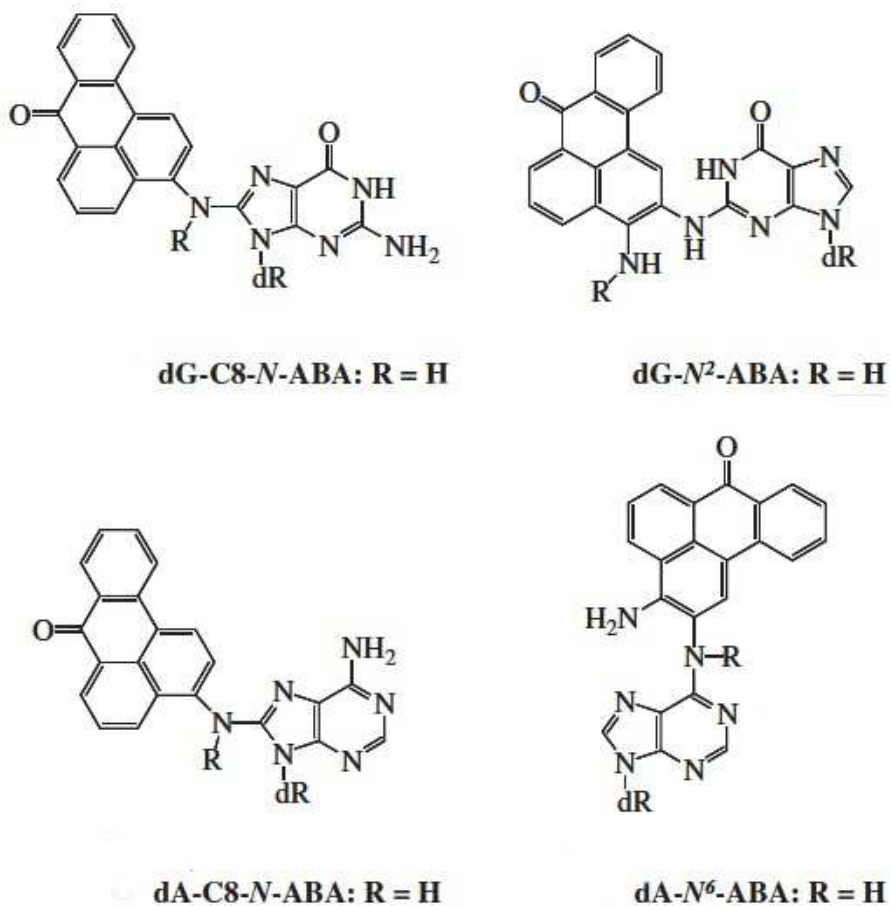
1.5.2 Mechanismus působení 3-NBA v organismu

Rakovina je stále větším zdravotním problémem pro naši populaci, jako nejčastější zhoubné onemocnění na světě se uvádí rakovina plic. Nejvýraznějším faktorem pro vznik nemoci je kouření, ale předpokládá se, že nemalý význam má i znečištěné ovzduší. To potvrzuje i to, že byly nalezeny adukty N-PAH v plicích nekuřáků trpících rakovinou plic [21,22].

Jako hlavní faktory při vzniku rakoviny se považují: životní styl (způsob výživy, kouření, životní prostředí). Genový polymorfismus, různorodost enzymů metabolizujících xenobiotika a hladina hormonů [21,22].

K detekci aduktů 3-NBA se nejčastěji používá metoda následného značení pomocí radioaktivního fosfátu „³²P-Postlabelling“ a následná vysokotlaká (HPLC) nebo tenkovrstvá chromatografie (TLC). Pomocí těchto metod bylo stanoveno pět kovalentních aduktů, metabolitů 3-NBA s DNA. Dalším zkoumáním bylo zjištěno, že adukty vznikají vázáním metabolitů na purinové báze a to na deoxyguanosin (dG) a Deoxyadenosin (dA) v poměru přibližně 70 % pro dG ku 30 % v prospěch vazby na dA. Sloučeniny byly identifikovány jako: 2-(2'-deoxyadenosin-N⁶-yl)-3-aminobenzanthron (dA-N⁶-ABA), N-(2'-deoxyguanosin -N²-yl)-3-aminobenzantron (dG-N²-ABA) a N-(2'-deoxyguanosin -8-yl)-3-aminobenzantron (dG-

C8-N-ABA), který je patrně nestabilní a zatím nebylo zcela určeno, co je jeho rozpadový produkt. Struktura posledního aduktu zatím nebyla jednoznačně určena, ale mohlo by se jednat o N-(2'-deoxyadenosin-8-yl)-3-aminobenzanthron (dA-C8-N-ABA) (Obrázek 6.)



Obrázek 6: Vzorce aduktů vznikajících při konjugaci s purinovou bází (převzato [12])

1.6 2-nitrobenzanthron

2-nitrobenzanthron (2-NBA), systematickým názvem 2-nitro-7H-benz(de)anthracen-7-on, je izomerem 3-NBA.

2-NBA je polutantem v životním prostředí, vzniká procesy v atmosféře. Jeho poměr k 3-NBA ve vzduchu byl určen jako 70:1 a byla naměřena hodnota 495 pg/m³, na rozdíl od koncentrace 3-NBA, která byla pouhých 6,8 pg/m³.

Genotoxické vlastnosti 2-NBA se v testech jeví o 1 - 4 řády nižší oproti 3-NBA a sloučenina je hodnocena jako slabě toxická (Tabulka 1, Tabulka 2) [16].

2. Cíl práce

Cílem práce bylo určit extinkční absorpční koeficienty 3-NBA a 2-NBA ve vodě i v methanolu. A také vypracovat a ověřit spektroskopické metody pro stanovení rozpustnosti obou látek ve vodě a popř. v jiných rozpouštědlech. Zjištěné hodnoty pak diskutovat v kontextu s některými fyzikálně chemickými veličinami s důrazem na vliv rozpustnosti na mutagenitu.

3. Materiál a metody

3.1 *Laboratorní přístroje a chemikálie*

Přístroje:

Spektrofotometr Hewlett - Packard 8453(HP 8453) s diodovým polem

Membránová čistírna vody s UV lampou-Millipore Simplicity 182

Ultrazvuková lázeň Elma E30H Elmasonic

Vodní lázeň

Centrifuga Beckmann ALEGRA x22R

Centrifuga MSE Sanyo Micro Centaur

Centrifuga Eppendorf 5418

Analytické váhy OHAUS discovery DU216CD

Chemikálie:

Voda

3-nitrobenzanthron

2-nitrobenzanthron

J.T.BAKER Nizozemí

Methanol pro chromatografické využití 99,9%

ALDRICH- SIGMA Německo

Dimetylsulfoxid 99,5% GC

LACHEMA Česká republika

Dimetylsulfoxid- čistý

Software:

UV- VIS Chemstation Agilent

MS Excel 2003, Microsoft Corporation

Origin7 OriginLab

3.2 Metoda a postup práce

3.2.1 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztoky 3-NBA v DMSO byly připraveny o koncentracích 2 mmol/l, 5 mmol/l a 200 μ mol/l.

Příprava roztoku spočívala v navážení zásobní látky do plastové mikrozkuhavky, přidání vypočteného množství rozpouštědla, sonikace a zahřátí. Pomocí centrifugace (2 min při 13000 rpm) na centrifuze Sanyo bylo ověřeno, že došlo k úplnému rozpuštění látky. Výsledné roztoky byly žluté barvy a byly stabilní po dobu minimálně 2 měsíců.

200 μ mol/l roztok byl připraven naředěním ze zásobního 2 mmol/l roztoku.

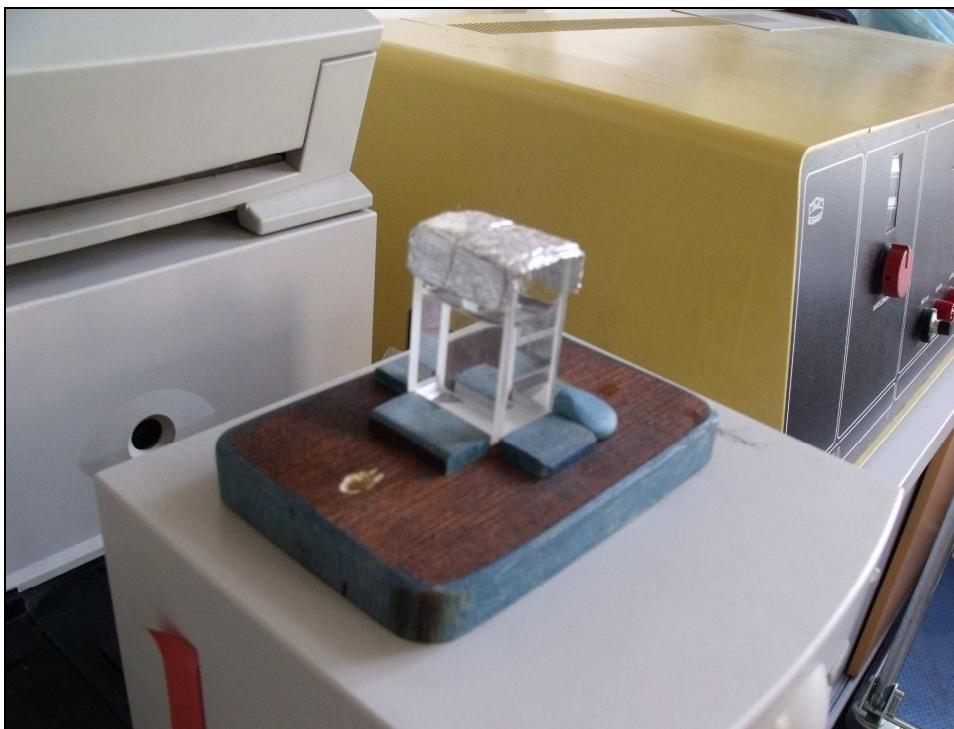
Při práci s 2-NBA byly zásobní roztoky připraveny stejným způsobem, jen jejich koncentrace byla 0,5 mmol/l a 1 mmol/l.

3.2.2 Měření absorbance roztoků 2- a 3-NBA na spektrofotometru HP 8453

K měření spekter byl použit spektrofotometr HP 8453 s diodovým polem a se schopností měřit vlnové délky s přesností 1 nm. Spektrofotometr měří v rozsahu od 190 do 1100 nm. Je vybaven dvěma lampami, a to nízkotlakou deuteriovou lampou pro rozsah vlnových délek 190 - 800 nm a wolframovou lampou pracující v rozsahu vlnových délek 370 - 1100 nm [23].

Spektrofotometr byl ovládán pomocí softwaru UV-VIS Chemstation. Základní nastavení spektrofotometru bylo pro obě metody stejné, integrační doba byla nastavena na 5 s, spektrofotometr měřil v režimu fixních vlnových délek. Ze spektra byly vybrány čtyři vlnové délky, se kterými bylo dále pracováno. 404 nm jako absorpční maximum 3-NBA a 2-NBA ve vodném prostředí. 390 nm jako absorpční maximum 2/3-NBA v metanolovém systému, 345 a 600 nm jako referenční vlnové délky s minimální absorpcí před a za maximem.

Spektrofotometr HP 8453 je vybaven nekrytým kyvetovým prostorem se stíněným držákem na kyvety s optickou drahou 1 cm a objemem 3 ml. Během pokusů se však ukázalo, že takto malý objem rozpouštědla je limitujícím faktorem, protože přídavek roztoku 3-NBA je na hranici možností přesného manuálního přídavku tj. < 0.5 μ l. Proto byl vyroben držák na 30 ml kyvetu vhodný pro spektrofotometr HP 8453 (Obrázek 7), čímž bylo umožněno zvýšit objem roztoku v kyvetě až 10x. Zároveň došlo k prodloužení optické dráhy na 3 cm, což se pozitivně odrazilo v citlivosti měření. Na druhou stranu použití skleněné kyvety si vyžádalo omezení použitelného rozsahu vlnových délek až od 320 nm.



Obrázek 7: Držák se vzorkem před umístěním do kyvetového prostoru.

Výpočet korekce na pozadí

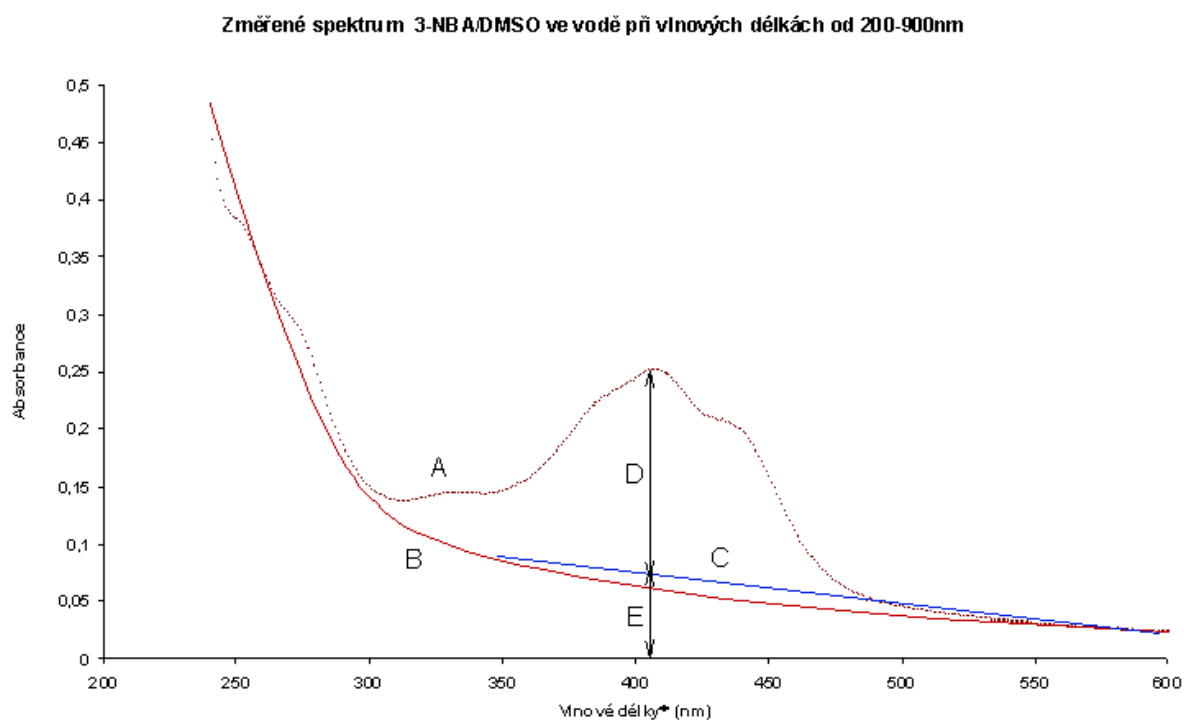
K redukci šumu u křivky s konstantním sklonem se běžně používá vícebodová korekce na pozadí, k tomu se využívají dvě referenční vlnové délky, které ji ohraničují [24].

Korekcí (Obrázek 8) mělo být dosaženo očištění absorpce BZ od absorpce balastní (červená křivka B), způsobené jinými látkami v systému nebo jinou chybou měření. Tato křivka šla v jistých částech proložit přímkou (modrá čára, C), pak absorpce v rozmezí ohraničeném absorpčním spektrem a přímkou C byla absorpce čisté látky a část mezi přímkou C z vrchu a osou x byla část balastní. Příspěvek jednotlivých vlnových délek byl určen tak, že jim byla dána váha podle vzdáleností od sledované vlnové délky (Obrázek 9, Obrázek 10), čím blíže, tím větší vliv. Tedy vzdálenost pro vlnovou délku 345 nm byla od vlnové délky 404 nm 0,3 jednotky, ale její vliv pak měl váhu 0,7. Hodnoty regulovaných veličin byly vypočteny z rovnic uvedených níže.

$$A_{404kor} = A_{404nm} - (0,7 \cdot 345 + 0,3 \cdot 600) \quad \text{Rovnice 1}$$

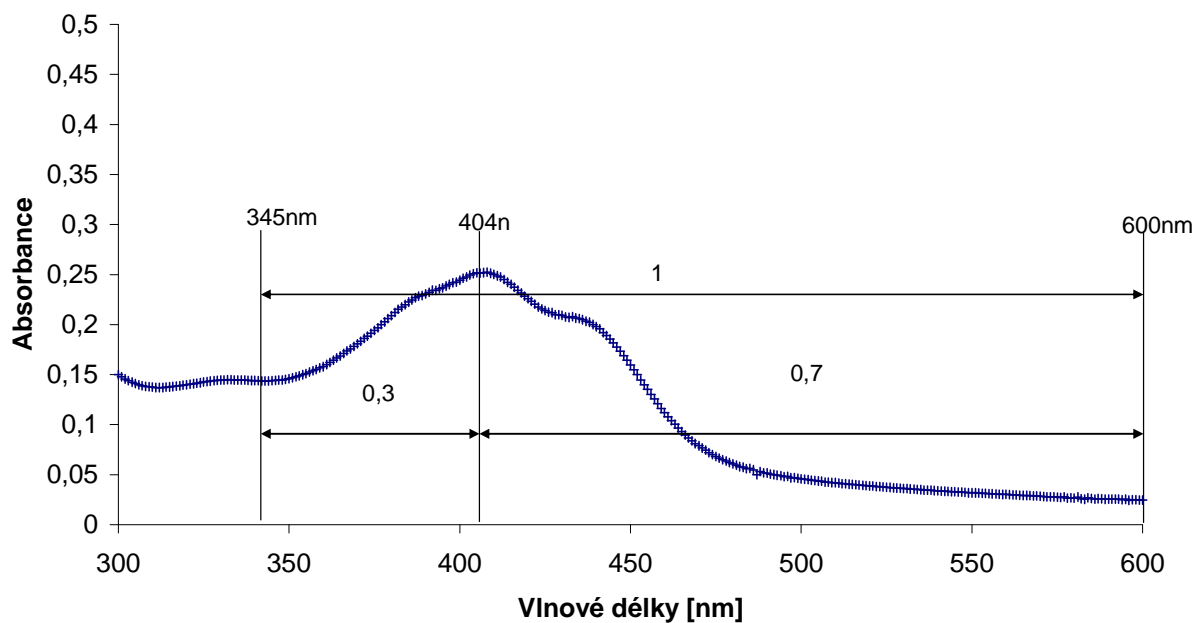
$$A_{390kor} = A_{390nm} - (0,8 \cdot 345 + 0,2 \cdot 600) \quad \text{Rovnice 2}$$

V tomto případě byla vybrána vlnová délka 345 nm, jakožto absorpční minimum, které předcházelo sledované vlnové délce a nebylo ovlivněno zvýšenou absorpcí světla kyvetou při používání skleněné kyvety. Jako druhá hodnota byla použita vlnová délka 600 nm, která byla dostatečně vzdálena od absorpčního maxima. V systému při této vlnové délce neměla žádná látka absorbovat. Obrázek 8 uvádí grafické znázornění této úvahy.



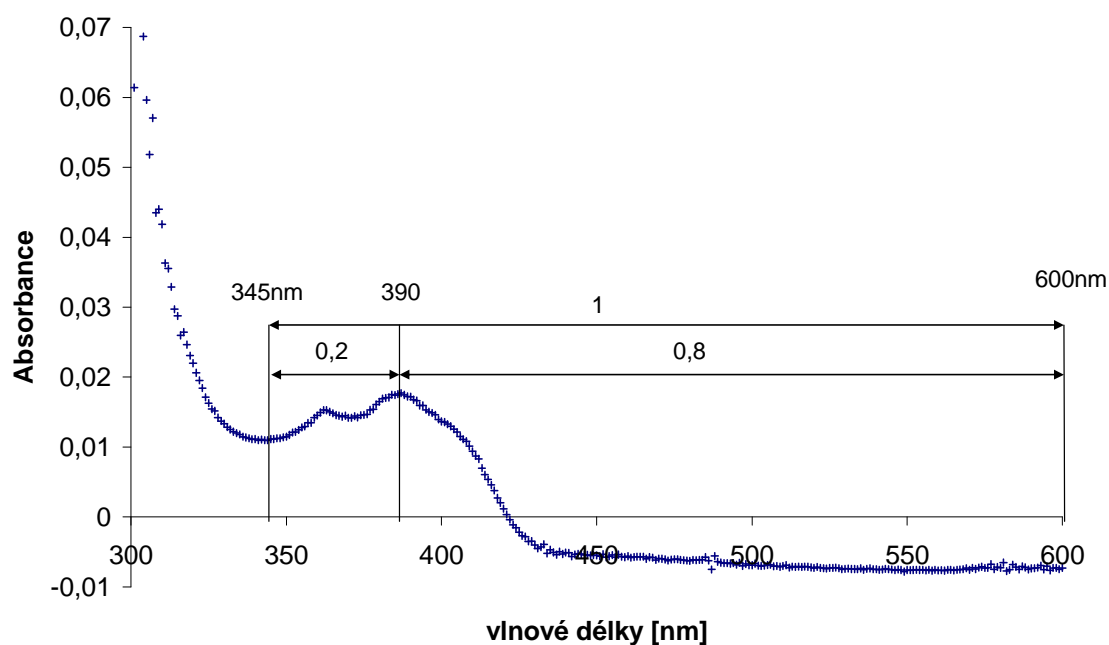
Obrázek 8: Grafické znázornění výpočtu korekční vlnové délky. A = spektrum 3-NBA od 200-600 nm, B = křivka zákalu, C = lineární proložení křivky, D = korigovaná absorpce 3-NBA, E = absorpce pozadí.

Spektrum 3-NBA ve vodě- grafické znázornění korekčního výpočtu



Obrázek 9: Grafické znázornění vážení příspěvku jednotlivých vlnových délek pro 3-NBA ve vodě.

Spektrum 2-NBA v methanolvém roztoku



Obrázek 10: Grafické znázornění vážení příspěvku jednotlivých vlnových délek pro 2-NBA v methanolu.

Zjištění extinkčního koeficientu roztoků 3-NBA a 2-NBA

K zjištění extinkčního koeficientu byly do různých objemů vody (2 ml, 1,5 ml a 25 ml) přidávány různě koncentrované roztoky 3-NBA v DMSO (2 mmol/l, 5 mmol/l a 200 μ M). Ty byly důkladně pipetou promíchány, aby se DMSO dobře promísil s vodou a došlo k rovnoměrné distribuci látky do celého objemu. Pak bylo proměřeno spektrum po každém přidavku. Jako referenční roztok byla použita přefiltrovaná destilovaná voda. Byly odečítány vlnové délky 404, 345 a 600 nm. Vždy bylo proměřeno alespoň 10 koncentrací a takto získaná data byla vynesena do grafu a proložena lineární regresní přímkou.

U přidavku roztoků 3-NBA v DMSO do methanolu bylo postupováno obdobně, jen objemy methanolu byly 1,5 ml a 25 ml. U roztoků 2-NBA byly používány jen objemy 25 ml. V methanolu byly odečítané vlnové délky 390, 345 a 600 nm.

Stanovení rozpustnosti pomocí ověření platnosti Lambert-Beerova zákona

Měření probíhalo analogicky jako při určování extinkčního koeficientu, jen přidavky byly opakovány do té doby, dokud růst absorbance nezačal vykazovat zřetelné odchylky od linearity, popřípadě nebyla patrná sraženina. Doba mezi přidavkem a odečtením absorbance byla 5 min.

Měření absorbance roztoku nad sraženinou

Sraženina byla připravena z roztoků 2/3-NBA v DMSO. Pro její vznik bylo přidáno množství až 200 μ l 5 mmol/l (1 mmol/l u 2-NBA) roztoku do 1,8 ml čisté vody. Takto připravený roztok se nechal stát při laboratorní teplotě, i když se sraženina tvořila takřka okamžitě. Po několika dnech byla mikrozkušavka centrifugována na centrifuze Eppendorf 10 minut a při 13 000 rpm. Následně byl odpipetován čirý roztok a změřena absorbance roztoku v křemenných kyvetách o délce 1 cm, proti přefiltrované destilované vodě. Sraženina NBA byla velice lehká a dost neochotně si sedá, proto se při pipetování musí postupovat velice opatrně, aby nedošlo k přenosu sraženiny do kyvety. Byla měřena absorbance v objemech 1,5 ml roztoku v kyvetách s optickou dráhou 1 cm.

Při přípravě methanolové sraženiny bylo postupováno obdobně, jen s tím rozdílem, že se sraženina nejprve připravila do vody, která byla následně odsána, a pak 1x propláchnuta methanolem. Následně byla plastová zkumavka doplněna 2 ml methanolu a nechala se stát.

Methanolové vzorky nasycené 3-NBA vykazovaly absorpenci vyšší než 3 a bylo nutné je naředit (1:1), aby hodnoty absorpencí byly v oblasti dobré odezvy přístroje.

Změna koncentrace ve vodném roztoku 3-NBA v čase

Při měření tohoto rozdílu bylo postupováno následovně: Do 25 ml čisté vody byl přidáván 1 nebo 2 mmol/l roztok 2-NBA nebo 3-NBA v DMSO, dokud nebylo dosaženo relativně vysokých koncentrací, ale stále zde byla lineární závislost absorpance nad koncentrací. Pak se vzniklý roztok přelil do plastové centrifugační kyvety (Beckmann) a nechal odstát při laboratorní teplotě 5 a 20 dní, následně byl roztok centrifugován po 20 minut při 21°C a 4500 rpm. Pipetou byl odsán roztok nad sedimentem a změřila se jeho absorpance při nastavení na spektrofotometru uvedeném výše. Při opakování pokusu byla jako nádoba, kde probíhalo srážení, použita skleněná Erlenmayerova baňka. Absorpance odstátých roztoků byla měřena jak v malé křemenné kyvetě o objemu 3 ml a optické délce 1 cm, tak v původní velké kyvetě o objemu 30 ml a optickém prostředí 3 cm.

Vliv DMSO na rozpustnost 3-NBA ve vodě

Do mikrozkušavky s 1,8 ml vody bylo přidáno 200 µl roztoku 5 mmol/l nebo 2 mmol/l roztoku 3-NBA v DMSO a roztoky se nechaly 5 dní vysrážet. Následně byl odpipetován podíl nad sedimentem a sraženina byla třikrát promyta jedním mililitrem vody. Sraženina byla rozdělena do tří zkumavek, pak byl odlit přebytečný roztok, a přidáno dopočtené množství vody a DMSO. Tak aby vznikly čtyři roztoky o koncentracích DMSO 0 %, 0,5 %, 1 % a 2 %. Tyto roztoky se nechaly 20 dní ustálit. Po ustálení byla ve všech vzorcích ještě přítomná sraženina, která byla odstraněna centrifugací a následně změřena absorpance čirého roztoku při laboratorní teplotě.

4. Výsledky

4.1 Určení extinkčních koeficientů roztoků 3-NBA a 2-NBA

V sérii několika měření byla sledována závislost mezi absorbancí při 404 nm korigovanou na případný zákal (Rovnice 1) a koncentrací roztoků 2-/3-NBA.

4.1.1 Extinkční koeficient 3-NBA ve vodě

Extinkční koeficienty ϵ_{404} a $\epsilon_{404\text{red}}$ 3-NBA ve vodě pro korigovanou $A_{404\text{red}}$ ($=A_{404} - (0,7 \cdot A_{345} + 0,3 \cdot A_{600})$) bylo možné odečíst celkem z 9 měření (Tabulka 5), z nich pak byla vypočtena standardní směrodatná odchylka i průměrná hodnota ϵ_{404} $11,8 \pm 0,7 \text{ l.mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a korigovaný $\epsilon_{404\text{red}}$ $8,2 \pm 1 \text{ l.mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Tabulka 5: Přehled měření extinkčního koeficientu 3-NBA ve vodě.

číslo měření	Směrnice*	délka kyvety [cm]	extinkční koeficient [$\text{l.mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] **	korigovaný extinkční koeficient* [$\text{l.mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
1.	23,884	3	12,13	7,96
2.	19,347	3	10,08	6,44
3.	23,779	3	11,95	7,92
4.	22,84	3	11,47	7,61
5	27,244	3	12,00	9,08
6.	30,58	3	12,22	10,19
7.	25,48	3	11,68	8,49
8.	25,709	3	12,53	8,57
9.	23,209	3	11,73	7,74
Průměr ±SD			11,8 ± 0,7	8,2 ± 1

* korigovaná $A_{404} = A_{404} - (0,7 \cdot A_{345} + 0,3 \cdot A_{600})$

** A_{404} bez korekce

4.1.2 Extinkční koeficient 3-NBA v methanolu

Pro výpočet extinkčních koeficientů v 3-NBA methanolu ϵ_{390} a $\epsilon_{390\text{red}}$ pro korigovanou vlnovou délku $A_{390\text{red}}$ ($=A_{390} - (0,8 \cdot A_{345} + 0,2 \cdot A_{600})$) bylo použito dvou měření (Tabulka 6), z nich

následně byla vypočtena průměrná hodnota i standardní směrodatná odchylka $A_{390\text{red}}$ $16,4 \pm 0,2 \text{ l.mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ a $19,8 \pm 0,2 \text{ l.mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Tabulka 6: Znázorňuje výpočty extinkčního koeficientu z lineárních úseku vybraných měření pro korigovanou vlnovou délku v systému 3-NBA v methanolu.

číslo měření	směrnice*	délka kyvety [cm]	extinkční koeficient [$\text{l.mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$] **	korigovaný extinkční koeficient* [$\text{l*mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$]
1.	16,221	1	19,97	16,22
2.	49,727	3	19,65	16,58
Průměr ± SD			$19,8 \pm 0,2$	$16,4 \pm 0,2$

* korigovaná $A_{404}=A_{404}-(0,7.A_{345}+0,3.A_{600})$

** A_{404} bez korekce

4.1.3 Extinkční koeficient 2-NBA v methanolu

Extinkční koeficienty ϵ_{390} a $\epsilon_{390\text{red}}$ pro naměřenou a korigovanou vlnovou délku byl v methanolvém roztoku určen pomocí výpočtu ze tří směrnic (Tabulka 7) pro $\epsilon_{390\text{red}}$ $4,3 \pm 0,1 \text{ l.mmol. cm}^{-1}$ a pro ϵ_{390} $4,3 \pm 0,1 \text{ l.mmol. cm}^{-1}$.

Tabulka 7: Výpočet extinkčního koeficientu 2-NBA pro methanolvý systém při korigované vlnové délce.

číslo měření	směrnice*	délka kyvety [cm]	extinkční koeficient [$\text{l.mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$] **	korigovaný extinkční koeficient* [$\text{l*mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$]
1.	13,541	3	7,656	4,51
2.	12,627	3	6,437	4,21
3.	12,771	3	8,664	4,26
Průměr ± SD			$7,6 \pm 0,6$	$4,3 \pm 0,1$

* korigovaná $A_{404}=A_{404}-(0,7.A_{345}+0,3.A_{600})$

** A_{404} bez korekce

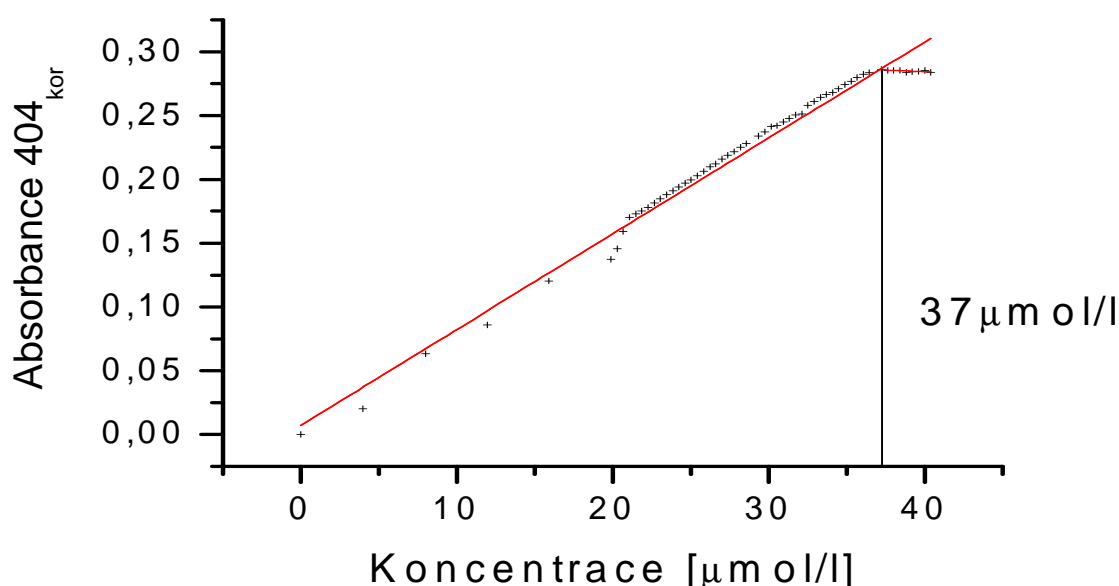
4.2 Stanovení rozpustnosti 3-NBA

K určení maximální rozpustnosti 3-NBA ve vodě a v methanolu byly použity dvě spektroskopické metody. První metoda byla založena na sledování absorbance vodného roztoku 3-NBA v závislosti na množství přidaného zásobního roztoku 3-NBA (2 mM v DMSO), tedy ověření platnosti Lambert-Beerova zákona. Druhá pak na prostém měření absorbance roztoku nad sraženinou.

4.2.1 Stanovení rozpustnosti 3-NBA ve vodě pomocí ověření platnosti Lambert-Beerova zákona

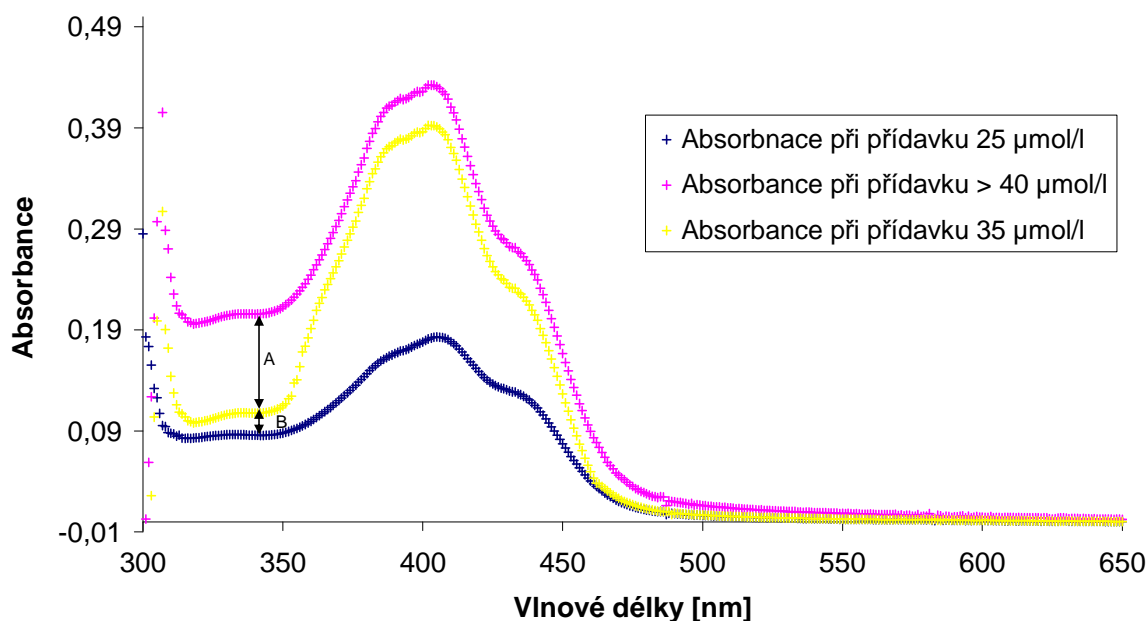
Do vody byl postupně přidáván roztok 3-NBA DMSO a byl sledován nárůst absorbance odpovídající absorpčnímu maximu 3-NBA ve vodě (404 nm) korigovanému na případný zákal (Rovnice 1). Z naměřených dat byl sestaven graf závislosti korigované vlnové délky na teoretické koncentraci 3-NBA (Obrázek 11). Absorbance rostla prakticky lineárně až do 37 $\mu\text{mol/l}$ 3-NBA, kdy se růst zastavil a korigovaná absorbance začala dokonce pomalu klesat. Při koncentraci pod 37 $\mu\text{mol/l}$ tvořil 3-NBA pravý roztok bez podílu zákalu (Obrázek 12). Při koncentraci nad 37 $\mu\text{mol/l}$ již spektrum vykazovalo významný příspěvek zákalu, který s dalšími přísadkami rostl. (Obrázek 12).

Obě části dat byly proloženy lineární regresí. Koncentrace pod průsečíkem pak odpovídala rozpustnosti 3-NBA v roztoku.



Obrázek 11: Graf závislosti absorbance na koncentraci v systému 3-NBA/DMSO - voda pro korigovanou vlnovou délku 404-(0,7*345+0,3*600). Graf znázorňuje lineární proložení dvou částí křivky, světle červená regrese znázorňuje oblast platnosti Lambert-Beerova zákona se směrnicí 24,23, tmavě červená část je proložena rozptylovou částí spektra se směrnicí - 1,505. V místě, kde se regrese protínají, je hledaná maximální koncentrace. Černá svislá čára vyznačuje vypočtenou maximální koncentraci.

Spektrum 3-NBA ve vodě



Obrázek 12: Spektrum 3-NBA ve vodě. Odpovídající koncentraci přidaného 3-NBA v 25 $\mu\text{mol/l}$. (modrá čára), a koncentraci $> 40 \mu\text{mol/l}$ (fialová čára) a absorbance přidavku odpovídající 35 $\mu\text{mol/l}$ (žlutá čára). Důležitý je nárůst absorpce pozadí kolem vlnové délky 345 nm, vyznačeny čarou A. a B. Nárůst v rozpuštěném roztoku je minimální, místě, kde došlo k vysrážení je nárůst enormní.

4.2.2 Stanovení rozpustnosti 3-NBA v methanolu pomocí ověření platnosti Lambert-Beerova zákona

Stanovení maximální koncentrace pomocí přidavku roztoku 3-NBA v DMSO do methanolu nebylo ve standardním uspořádání možné, protože absorbance vzorku byla příliš vysoká, blížila se ke 2,5 (absorbance při 390 nm bez korekce se blížila ke 3) a byla tak již mimo rozsah spektrofotometru. Hodnota rozpustnosti v methanolu pak byla zjištěna jinou metodou – viz kapitola 4.2.3.

Maximální dosažená hodnota koncentrace byla v tomto stanovení dopočtena pro nejvyšší absorpci, při použití extinkčního koeficientu pro 3-NBA v methanolu byla 122 $\mu\text{mol/l}$ při absorbanci 2,36.

4.2.3 Stanovení rozpustnosti 3-NBA měřením koncentrace látky nad sraženinou

Druhá metoda stanovení rozpustnosti byla založena na klasickém měření koncentrace nad sraženinou. I u této metody byl použit výpočet s korekcí na pozadí a stejné nastavení spektrofotometru jako v předcházejících případech. Ze stanovení průměrného extinkčního koeficientu ($\epsilon_{\text{red}}=8 \text{ l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), který byl dosazen do Lambert-Beerova zákona.

Do výpočtu rovnice byly dosazeny naměřené hodnoty absorbance roztoku nad sraženinou 3-NBA ve vodě, které byly získány měřením v 1 cm kyvetě. Průměrná koncentrace 3-NBA ve vodném roztoku nad sraženinou byla $4 \pm 2 \mu\text{mol/l}$. Tato hodnota byla určena ze sedmi na sobě nezávislých měření.

Tabulka 8: přehled hodnot použitých k výpočtu koncentrace nad sraženinou 3-NBA ve vodě.

číslo měření	$A_{404\text{kor}}$	extinkční koeficient [$\text{l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]	délka kyvety [cm]	Koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]
1.	4,75E-03	8	1	5,94
2.	4,76E-03	8	1	5,96
3.	3,84E-02	8	1	4,80
4.	3,87E-02	8	1	4,84
5.	3,88E-02	8	1	4,85
6.	3,89E-02	8	1	4,86
7.	7,76E-02	8	1	9,71
Průměr ± SD				4 ± 2

U methanolového vzorku bylo postupováno obdobně a zjištěná koncentrace byla 130 ± 6 $\mu\text{mol/l}$. Vzorky byly ředěny methanolem 1:1, aby se absorbance dostala pod 1,5. Byla provedena čtyři nezávislá měření.

4.2.4 Stanovení změny koncentrace ve vodném roztoku 3-NBA v čase

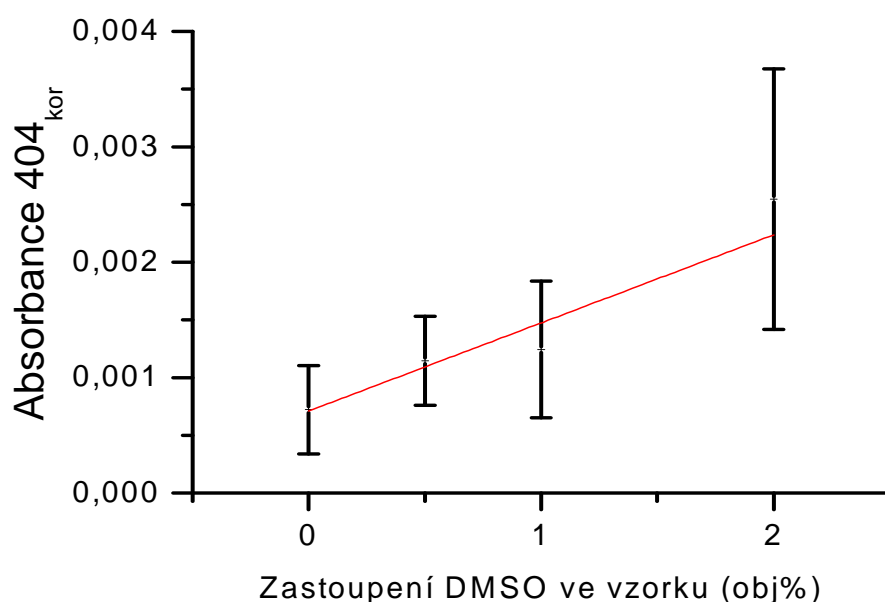
Při vyhodnocování této závislosti bylo postupováno následovně: použil se již výše zjištěný extinkční koeficient pro vodný roztok, který se spolu s maximální hodnotou absorbance ihned po přidavku zásobního roztoku 3-NBA a změřenou hodnotou absorbance po pěti dnech (roztok se předtím centrifugoval na centrifuze Beckmann při 4500 otáčkách po 20 minutách) dosadil do Lambert–Beerova zákona. Výsledné koncentrace se porovnaly.

Při pokusu ve skleněné nádobě (Erlenmayerova baňka) byla maximální koncentrace po posledním přidavku zásobního roztoku 3-NBA ve vzorku $22,7 \mu\text{mol/l}$. Po pěti dnech klesla na hodnotu $13,4 \pm 0,07 \mu\text{mol/l}$.

4.2.5 Stanovení vlivu DMSO na koncentraci 3-NBA ve vodném roztoku

Aby bylo možné zjistit, jaký je vliv rozpouštědla DMSO na rozpustnost 3-NBA ve vodě, byly změřeny absorbance vodných roztoků 3-NBA s různým procentuálním zastoupením DMSO.

Stanovení vlivu DMSO bylo vyhodnoceno z grafu, do kterého byly vyneseny průměrné hodnoty absorbancí různých roztoků 3-NBA s různým zastoupením DMSO (0-2%). I když bylo provedeno velké množství měření (v průměru deset) od každé ze čtyř koncentrací DMSO, byly výsledné hodnoty zatíženy dost výraznou chybou. Proto byly proloženy v programu Origin 7 váženou funkcí podle SD (Obrázek 13). Z hodnoty korelačního koeficientu $R=0,93$, můžeme usuzovat, že zde existuje významná závislost mezi rozpustností a procentuálním zastoupením DMSO ve vzorku. Lze říci, že 2% zastoupení DMSO ve vodném roztoku zvyšují rozpustnost 3-NBA ve vodě přibližně 3,5x.

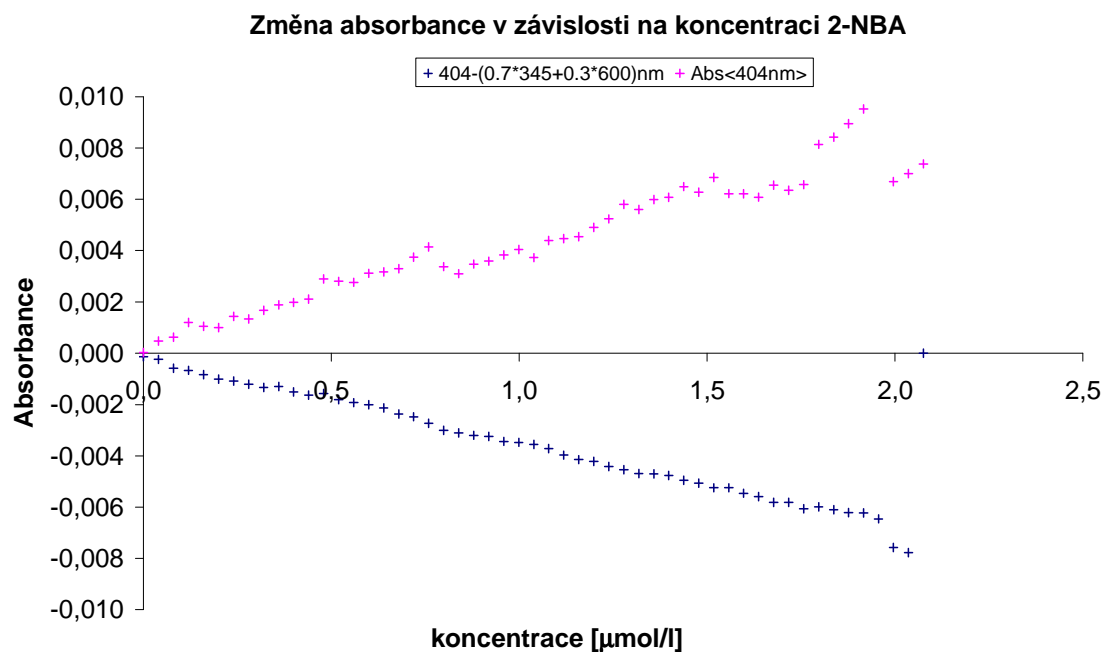


Obrázek 13: Graf znázornění rostoucí absorpce při korigované vlnové délce na zastoupení DMSO. Znázorněno v objemovém zlomku - červená čára - proložení lineární funkce, popisující rostoucí vliv DMSO na rozpustnost 3-NBA.

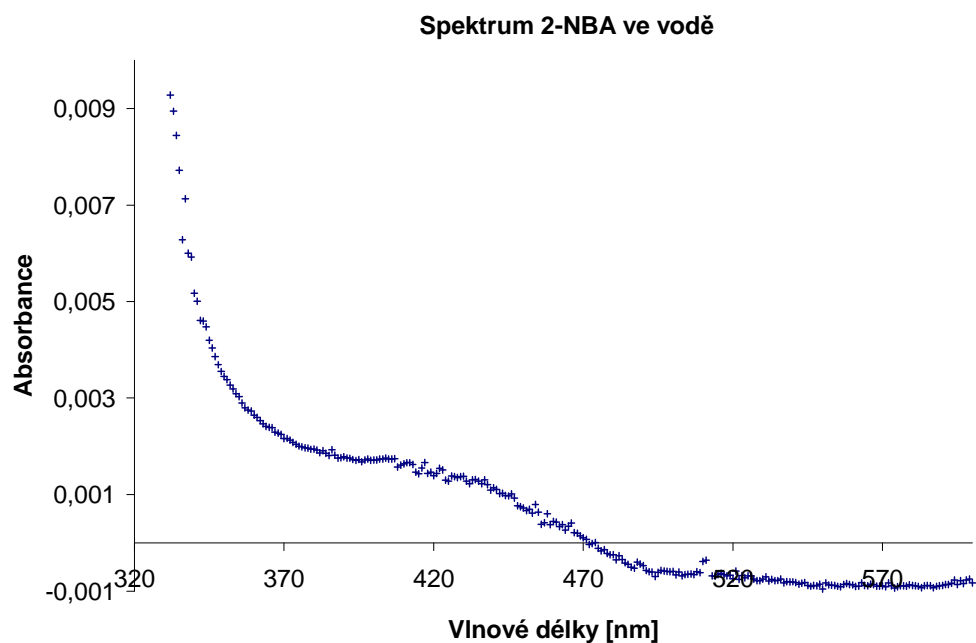
4.3 Stanovení rozpustnosti 2-NBA

4.3.1 Stanovení rozpustnosti 2-NBA ve vodě pomocí ověření platnosti Lambert-Beerova zákona

Do vody byl postupně přidáván roztok 2-NBA v DMSO, za účelem sledování nárůstu absorpce v závislosti na koncentraci do míst, kde absorpční spektrum začne vykazovat nárůst příspěvku spektra rozptylového. Tento přechod se však zachytit nepodařilo, jelikož již první přidavek (0,5 μ l) vykazoval signifikantní nárůst rozptylu. Na grafu z naměřených dat pro vlnovou délku 404 nm a korigovanou vlnovou délku, je pro 404_{red} vidět výrazný nárůst pozadí, korigovaná A_{404red} dokonce s dalšími přidavky klesá (Rovnice 1). Tento pokles je pravděpodobně způsoben ne zcela lineárním průběhem rozptylového spektra v rozmezí vlnových délek používaných ke korekci na pozadí (345 - 600 nm) (Obrázek 8). Dalším ukazatelem nízké rozpustnosti 2-NBA může být rozptylové spektrum získané již při velice malém přidavku 2-NBA (Obrázek 15).



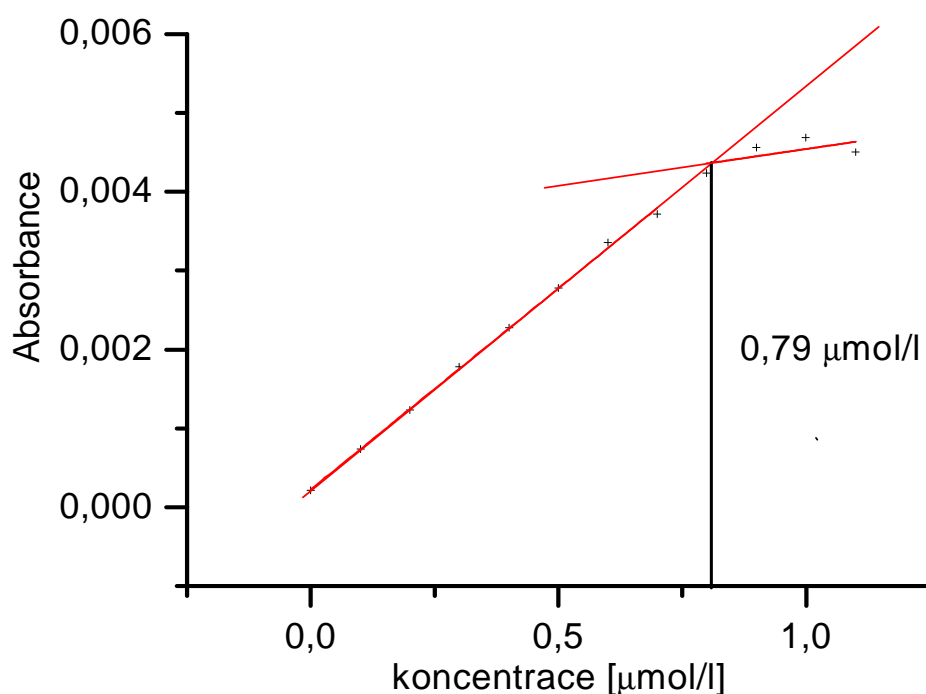
Obrázek 14: Graf znázorňující změnu absorbance na koncentraci. Fialové body - absorbance při 404 nm, modré body - absorbance při korigované vlnové délce, zde je patrný enormní nárůst pozadí v podstatě už od prvního bodu.



Obrázek 15: spektrum 2-NBA ve vodě při přidané koncentraci 0,07 $\mu\text{mol/l}$.

4.3.2 Stanovení rozpustnosti 2-NBA v methanolu pomocí ověření platnosti Lambert-Beerova zákona

Stejně jako u stanovení 3-NBA byl postupně přidáván roztok 2-NBA DMSO do methanolu a byl sledován nárůst absorpce v maximu 2-NBA v methanolu (390 nm) korigovaném na zákal podle výpočtu (Rovnice 2). Ze získaných dat byl sestrojen graf závislosti absorpance korigované vlnové délky na teoretické koncentraci. Ten lineárně stoupal až do koncentrace $0,79 \pm 0,03 \mu\text{mol/l}$. Nad touto koncentrací byl pozorován významný příspěvek zákalu k absorbanci.



Obrázek 16: Graf závislosti absorpance na koncentraci v systému 3-NBA/DMSO - MEOH pro korigovanou vlnovou délku 390-($0,8.345+0,2.600$)). Graf znázorňuje lineární proložení dvou částí křivky, světle červená regrese znázorňuje oblast platnosti Lambert-Beerova zákona. Tmavě červená část je proložena rozptylovou částí spektra. V místě, kde se regrese protínají, je hledaná maximální koncentrace. Černá svislá čára vyznačuje vypočtenou maximální koncentraci.

4.3.3 Stanovení rozpustnosti 2-NBA měřením koncentrace látky nad sraženinou

Toto stanovení bylo založeno jako v případě 3-NBA na klasickém sledování koncentrace nad sraženinou. V methanolvém roztoku byl použit výpočet absorbance s korekcí na pozadí (Rovnice 2). Za extinkční koeficient byl do Lambert–Beerova zákona dosazen již změřený koeficient v methanolvém roztoku ($\epsilon_{390\text{red}} = 4,3 \text{ l.mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Do rovnice byly dosazené hodnoty absorbancí změřených v 1 cm kyvetě. Výsledná hodnota rozpustnosti 2-NBA v methanolu pak byla $0,84 \pm 0,02 \text{ } \mu\text{mol/l}$.

Stanovení touto cestou nebylo ve vodném roztoku možné, protože se nepodařilo zcela oddělit velmi jemnou sraženinu, která pak znemožnila spektrofotometrické stanovení 2-NBA. Proto tato hodnota byla získána extrapolací viz. 4.3.4

4.3.4 Stanovení rozpustnosti 2-NBA ve vodě pomocí extrapolace

Rozpustnost 2-NBA ve vodě můžeme odhadovat pomocí zkušenosti z určení koncentrace 3-NBA ve vodě a v methanolu.

Koncentrace 3-NBA ve vodě měřená nad sraženinou byla $4 \text{ } \mu\text{mol/l}$, to je přibližně 33x méně než jeho koncentrace v methanolu, která bylo $130 \text{ } \mu\text{mol/l}$. Rozpustnost 2-NBA v methanolu je $0,84 \text{ } \mu\text{mol}$. Lze se domnívat, že může být také přibližně 33x nižší, tedy $0,025 \text{ } \mu\text{mol/l}$.

Koncentrace 2-NBA ve vodě se nepodařila změřit, i přesto, že zde bylo postupováno daleko s nejmenším krokem přidavku, což bylo $0,5 \text{ } \mu\text{l}$ $0,5 \text{ mmol/l}$ zásobního roztoku 2-NBA DMSO do 25 ml vody a již zde výrazně vzrostlo pozadí. Nicméně rozpustnost sloučeniny je možno přibližně určit pomocí lineární extrapolace z dat maximálních koncentrací 3-NBA v methanolu a vodě a 2-NBA methanolu. U 3-NBA je tento rozdíl 33x nižší ve vodném roztoku než v alkoholovém. Pokud tato korelace opravdu funguje, tak je koncentrace 2-NBA ve vodě přibližně $0,025 \text{ } \mu\text{mol/l}$

5. Závěr a diskuze

Byly stanoveny extinkční koeficienty 3-NBA ve vodě a methanolu (Tabulka 9), přičemž extinkční koeficienty v methanolu jsou cca 2x vyšší než ve vodě. Chyba stanovení vyjádřená jako SD je u vodných roztoků výrazně větší než v methanolu, což je pravděpodobně zapříčiněno vyšším počtem časově značně odlehlých měření. V případě extinkčních koeficientů 2-NBA bylo možné, následkem jeho velmi nízké rozpustnosti ve vodě, stanovit pouze koeficient v methanolu. Zajímavé je, že extinkční koeficienty 2-NBA v methanolu jsou asi 4x nižší než u 3-NBA.

Tabulka 9: přehled určených extinkčních koeficientů.

metoda	3-NBA	2-NBA	Jednotka
Zjištění ϵ_{404} pro vodné roztoky	$0,0118 \pm 0,007$	-	$l \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
Zjištění $\epsilon_{404\text{kor}}$ pro vodné roztoky	$0,008 \pm 0,001$	-	$l \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
Zjištění ϵ_{404} pro methanoloové roztoky	$0,0198 \pm 0,0002$	$0,0076 \pm 0,0006$	$l \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
Zjištění $\epsilon_{404\text{kor}}$ pro methanoloové roztoky	$0,0164 \pm 0,0002$	$0,0043 \pm 0,0001$	$l \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$

Rozpustnost 3-NBA ve vodě byla stanovena dvěma technikami: (1) ověřením platnosti Lambert-Beerova zákona a (2) měřením rovnovážné koncentrace látky nad sraženinou (Tabulka 10). Z počátku byla pomocí první metody stanovena hodnota rozpustnosti 3-NBA ve vodě ($37 \mu\text{mol/l}$), druhá metoda však poskytla dosti rozdílnou hodnotu rozpustnosti pouhých $4 \pm 2 \mu\text{mol/l}$. Pro objasnění tohoto rozdílu bylo proto přikročeno ke sledování vlivu malých množství DMSO na rozpustnost 3-NBA ve vodě. Ukázalo se, že i pouhá 2 % DMSO zvyšují rozpustnost cca 3,5x. Pomocí extrapolace na 0 % DMSO pak byla získána hodnota $10,6 \mu\text{mol/l}$, která byla ale stále oproti druhému měření asi dvojnásobná. Jedním z rozdílů mezi oběma stanoveními byla také doba ustalování rovnováhy mezi roztokem a pevnou fází. Je tedy možné, že během měření využívajícím metodu ověření platnosti Lambert-Beerova zákona došlo jen ke zdánlivému ustálení rovnováhy v roztoku a vznikl přesycený roztok. Proto byla také změřena absorbance vodného roztoku (s 2% DMSO) po pěti dnech stání ve tmě při laboratorní teplotě. Tato metoda poskytla po korekci na přítomnost DMSO hodnotu

rozpustnosti 3,8 $\mu\text{mol/l}$ (Tabulka 10). Tato hodnota je již srovnatelná s hodnotou rozpustnosti získanou i měřením rovnovážné koncentrace látky nad sraženinou.

Rozpustnost 3-NBA v methanolu byla opět stanovována dvěma technikami: (1) ověřením platnosti Lambert-Beerova zákona a (2) měřením rovnovážné koncentrace látky nad sraženinou (Tabulka 10). Rozpustnost 3-NBA v methanolu je poměrně vysoká, takže se ji první technikou nepodařilo změřit kvůli překročení vhodného absorbančního rozsahu spektrofotometru ještě před dosažením koncentrace, při níž by došlo k precipitaci. Nicméně použitím dříve stanoveného extinkčního koeficientu byla získána hodnota koncentrace 3-NBA nad sraženinou v methanolu, která odpovídala koncentraci nasyceného methanolového roztoku - 130 $\mu\text{mol/l}$. Tento roztok neobsahoval žádný DMSO.

Rozpustnost 2-NBA v methanolu byla úspěšně stanovena dvěma technikami: (1) ověřením platnosti Lambert-Beerova zákona a (2) měřením rovnovážné koncentrace látky nad sraženinou (Tabulka 10). Takto získané hodnoty rozpustností se v rámci chyby měření prakticky neliší. Zdá se, že v tomto případě můžeme vliv DMSO zanedbat, pravděpodobně také proto, že jeho koncentrace ve směsi je poměrně nízká (0,13 %). A i zde můžeme brát tyto hodnoty za určující rozpustnost 2-NBA v methanolu.

Rozpustnost 2-NBA ve vodě je zřejmě pod hranicí citlivosti stanovení pomocí metody využívající ověřením platnosti Lambert-Beerova zákona. Lze tedy zatím jen konstatovat, že je nižší než 0,04 μM , což je při optické dráze 3 cm dolní hranice citlivosti metody. Druhá metoda (měření rovnovážné koncentrace látky nad sraženinou) zde selhala, protože velice jemnou sraženinu, která byla pro toto stanovení použita, se nepodařilo oddělit od roztoku centrifugací. Přítomnost sraženiny způsobující zákal pak znemožnila spektrofotometrické stanovení.

Další možností, jak hodnotu rozpustnosti 2-NBA ve vodě získat, byla extrapolace za předpokladu lineární závislosti mezi rozpustností 3-NBA v methanolu a vodě. Výsledná hodnota pak byla 0,026 $\mu\text{mol/l}$ (Tabulka 10).

Výsledky jednotlivých metod určují rozpustnost obou nitro derivátů NBA ve vodě a v methanolu. Při rámcovém pohledu zjistíme, že mezi rozpustností 3-NBA a 2-NBA ve vodě je minimálně třířádkový rozdíl, popřípadě dvouřádkový rozdíl rozpustnosti v methanolu. Tato skutečnost by mohla mít významný vliv na biologickou dostupnost 2-NBA. Pokud je tedy biologická dostupnost výrazně nižší než u 3-NBA, může mít vliv na rozdílnou účinnost redukce jednotlivých derivátů NBA pomocí nitroreduktáz jako je NQO1. Tedy, že není důležitá jen předpověděná horší orientace nitroskupiny 2-NBA v aktivním centru NQO1

oproti 3-NBA, ale pravděpodobný je i nedostatek rozpuštěného 2-NBA jako substrátu vhodného pro redukční aktivaci.

Navíc z výsledků o změně koncentrace v čase (Tabulka 10) je patrné, že 3-NBA ochotněji tvoří přesycené roztoky, ve kterých se jen velmi pomalu ustavuje rovnováha mezi kapalnou a pevnou fází. I tato vlastnost by mohla být významná při porovnávání biologické dostupnosti 3-NBA a 2-NBA.

Tabulka 10: Přehled zjištěných rozpustností nitrobenzanthronů při laboratorní teplotě.

Metoda a podmínky stanovení	Rozpustnost [$\mu\text{mol/l}$]	
	3-NBA	2-NBA
Nejvyšší změřená koncentrace ve vodném roztoku s přidavkem DMSO	37,0 (v 2% DMSO)	<0.04 (v 0,002% DMSO)
Nejnižší koncentrace ve vodném roztoku ve skleněné nádobě po 5 dnech	13,4 \pm 0,07 $N=4$	ruší zákal
koncentrace 3NBA ve vodném roztoku s DMSO extrapolovaná na 0 % DMSO	\sim 10,6	<0.001*
Nejnižší koncentrace ve vodném roztoku ve skleněné nádobě po 5 dnech extrapolovaná na 0 % DMSO	\sim 3.8	ruší zákal
Nejvyšší změřená koncentrace v methanolvém roztoku s přidavkem DMSO	>122** (v 2% DMSO)	0,79 \pm 0,03 $N=3$ (v 0,13% DMSO)
Nejvyšší zjištěná koncentrace nad sraženinou ve vodě	4 \pm 2 $N=7$	0,026***
Nejvyšší zjištěná koncentrace nad sraženinou v methanolu	130 \pm 6 $N=4$	0,84 \pm 0,02 $N=3$

* za předpokladu, že vliv 2% DMSO je stejný jako u 3-NBA

** dopočteno z nejvyšší změřené absorbance a extinkčního koeficientu v methanolu

*** extrapolovaná hodnota

6. Citovaná literatura

1. P. Stratil, V. Kuban (2004) Princip Karcinogeneze a přírodní karcinogenní sloučeniny v potravinách. *Chem. Listy*. **98**, 379-384.
2. Stiborová, M. (2010) *Xenobiochemie* (Přednáška na UK).
3. Stiborová, M., Mikšanová, M. (1999) Molekulární mechanismus kancerogeneze. *Živa*.
4. Stiborová, M. (2010) *Biochemie jako teoretický základ biomedicíny* (Přednáška na UK).
5. Voet, D., Voet, J.G. (2004) *Biochemistry* (Biochemistry (Wiley). 4th Ed.
6. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2009) *Essential Cell Biology* (Garland Science). 3rd Ed.
7. Marie Stiborová (2002) Aromatické sloučeniny: kontaminanty životního prostředí a potenciální karcinogeny pro člověka. *Chem. Listy*, 784-791.
8. Arlt, V.M., Glatt, H., Muckel, E., Pabel, U., Sorg, B.L., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H. (2002) Metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferase. *Carcinogenesis*. **23**, 1937-1945.
9. Stiborová, M. (2002) Aromatické nitrosloučeniny: kontaminanty životního prostředí a potenciální karcinogeny pro člověka. *Chem. Listy*. **98**.
10. Enya, T., Suzuki, H., Watanabe, T., Hirayama, T., Hisamatsu, Y. (1997) 3-Nitrobenzanthrone, a Powerful Bacterial Mutagen and Suspected Human Carcinogen Found in Diesel Exhaust and Airborne Particulates. *Environmental Science & Technology*. **31**, 2772-2776.
11. Takamura-Enya, T., Suzuki, H., Hisamatsu, Y. (2006) Mutagenic activities and physicochemical properties of selected nitrobenzanthrones. *Mutagenesis*. **21**, 399-404.
12. Arlt, V.M. (2005) 3-Nitrobenzanthrone, a potential human cancer hazard in diesel exhaust and urban air pollution: a review of the evidence. *Mutagenesis*. **20**, 399-410.
13. <http://de.wikipedia.org/wiki/S9-mix> URL: 3.5.2011.
14. Reynisson, J., Stiborová, M., Martínek, V., Gamboa da Costa, G., Phillips, D.H., Arlt, V.M. (2008) Mutagenic potential of nitrenium ions of nitrobenzanthrones: correlation between theory and experiment. *Environ. Mol. Mutagen.* **49**, 659-667.
15. Stiborova, M., Martinek, V., Svobodova, M., Sistkova, J., Dvorak, Z., Ulrichova, J., Simanek, V., Frei, E., Schmeiser, H., Phillips, D., Arlt, V. (2010) Mechanisms of the Different DNA Adduct Forming Potentials of the Urban Air Pollutants 2-Nitrobenzanthrone and Carcinogenic 3-Nitrobenzanthrone. *Chemical Research in Toxicology*. **23**, 1192-1201.
16. Arlt, V.M., Glatt, H., Gamboa da Costa, G., Reynisson, J., Takamura-Enya, T., Phillips, D.H. (2007) Mutagenicity and DNA adduct formation by the urban air pollutant 2-nitrobenzanthrone. *Toxicol. Sci.* **98**, 445-457.
17. Nagy, E., Adachi, S., Takamura-Enya, T., Zeisig, M., Möller, L. (2007) DNA adduct formation and oxidative stress from the carcinogenic urban air pollutant 3-nitrobenzanthrone and its isomer 2-nitrobenzanthrone, in vitro and in vivo. *Mutagenesis*. **22**, 135-145.

18. Arlt, V.M., Cole, K.J., Phillips, D.H. (2004) Activation of 3-nitrobenzanthrone and its metabolites to DNA-damaging species in human B lymphoblastoid MCL-5 cells. *Mutagenesis*. **19**, 149-156.
19. Stiborová, M., Arlt, V.M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Frei, E., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H. (2005) Molecular mechanism of genotoxicity of the environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* **149**, 191-197.
20. Stiborová, M., Dracínská, H., Hájková, J., Kaderábková, P., Frei, E., Schmeiser, H.H., Soucek, P., Phillips, D.H., Arlt, V.M. (2006) The environmental pollutant and carcinogen 3-nitrobenzanthrone and its human metabolite 3-aminobenzanthrone are potent inducers of rat hepatic cytochromes P450 1A1 and -1A2 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *Drug Metab. Dispos.* **34**, 1398-1405.
21. Sabbioni, A., Jones, C., Sepai, O., Hirvonen, A., Norppa, H., Jarventaus, H., Glatt, H., Pomplun, D., Yan, H., Brooks, L., Warren, S., DeMarini, D., Liu, Y. (2006) Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility in workers exposed to nitrotoluenes. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. **15**, 559-566.
22. Arlt, V.M., Stiborova, M., Henderson, C.J., Osborne, M.R., Bieler, C.A., Frei, E., Martinek, V., Sopko, B., Wolf, C.R., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H. (2005) Environmental pollutant and potent mutagen 3-nitrobenzanthrone forms DNA adducts after reduction by NAD(P)H:quinone oxidoreductase and conjugation by acetyltransferases and sulfotransferases in human hepatic cytosols. *Cancer Res.* **65**, 2644-2652.
23. Agilent (2000) Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System. URL: <http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G1103-90004.pdf>, 27.5.2011.
24. <http://www.chem.agilent.com/Library/Support/Documents/a10706.pdf> URL: 23.5.2011.

Evidence zapůjčení práce:

Jméno a adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka